



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
UN MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO
GAIT EN EL EXTREMO 3' DEL GENOMA DEL
TGEV QUE MODULA LA RESPUESTA
INMUNE INNATA**

Memoria presentada por Silvia Márquez Jurado
para optar al grado de Doctor en Ciencias por la
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Febrero de 2015



El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Fernando Almazán Toral y Luis Enjuanes Sánchez.

Madrid, Febrero de 2015

Fdo. Fernando Almazán Toral

Fdo. Luis Enjuanes Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Apunto de coronar este largo puerto que ha sido el desarrollo de esta tesis miro hacia abajo y veo a muchas personas que de una manera u otra me han acompañado en su ascenso. Todos, absolutamente todos, me habéis dejado huellas, enseñanzas, vivencias... por ello, sólo puedo deciros GRACIAS.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis y coparticipes de este trabajo, el profesor Luis Enjuanes y el Doctor Fernando Almazán, por confiar en mí para incorporarme en el grupo de Coronavirus y darme la oportunidad de formarme como científico. Gracias Luis por tu apoyo constante y por todas las facilidades y medios con que has contribuido a mi formación dentro de tu laboratorio. Gracias Fernando por ayudarme a crecer como persona y como científico, y por aguantarme y hacer de psicólogo en tantas ocasiones.

He tenido la suerte de trabajar en una laboratorio de primer nivel científico y sobre todo personal. Estaré eternamente agradecida a mis compañeros del 114 por ayudarme siempre que lo he necesitado. Quiero empezar acordándome de mis hermanos científicos, Carmen Galán y Aitor Nogales, habéis sido un ejemplo a seguir, gracias por vuestros consejos, muchos de los cuales resuenan una y otra vez en mi cabeza. JMJ y JAR, los PDZ boys, sois unos crack, habéis amenizado el final de las tardes. Charly junior no te puedes ni imaginar lo que me he reído contigo. Quiero darle las gracias a Isabel por estar siempre disponible y de buen humor para cualquier consulta. Sonia gracias por adoptarme en tantas ocasiones como hija científica, por el apoyo continuo y sobre todo por tus consejos. Carlos, sheriff de cultivos y dj del paleolítico, gracias por enseñarme a titular y por endurecerme los tímpanos, sin ti ésta tesis hubiera sido mucho mas aburrida. Raúl, the mice killer, eres la mejor persona, con más experiencia y amabilidad que conozco, aunque atropelles farolas, no cambies nunca. No quiero olvidarme de todos aquellos con los que he coincidido pero que ya vuelan por libre, Marta, Pedro, Sarhay, Kike. Jazmina y Lorena, sin vosotras no hubiera sobrevivido a mi aterrizaje tanto en la ciudad como en el laboratorio.

Pero sobre todo quiero agradecerle a mis amigos, a mi familia del 114. Jose, Martina y Lucía, sois sin lugar a dudas lo mejor que me llevo de mi paso por este laboratorio porque formáis parte de mi vida fuera de él. Para cualquier cosa que necesitéis ya sabéis donde encontrarme.

Dr. Francisco José Iborra, bueno Ibo, que si no la gente no te va a identificar. No hay suficientes palabras en el diccionario andaluz (que es el que mas controlo) ni español para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias por sacarme de ese ambiente molecular en que vivimos los virólogos para mirar la ciencia con unos ojos mas globales, gracias por tus chistes, gracias por tus locuras, gracias por tu ayuda,

gracias por estar siempre disponible. Eres para mi un ejemplo de trabajo constante, la ciencia te debe un golpe de buena suerte.

Las niñas del 116, Sarita y Lydia, las otras dos miembros de mi familia de Madrid. Con vosotras da gusto estar en el pasillo del departamento, en cultivos, en un castillo en medio de la nada, en un congreso... pero sobre todo en la calle. Gracias por estar a las duras y a las maduras, gracias por ser mis piojosillas. No quiero salir del 116 sin acordarme de Joan, hemos estado juntos en gran parte de mis mejores recuerdos como culé, ayyy el Iniestazo.

Que decir de mis chicas del 118 (Noe, Ale, Jaz, Ana, Paloma, Laura y su mini yo interno, bueno, y del chico Pablo) con Amelia a la cabeza. Infinitas gracias por vuestra maravillosa acogida, me habéis hecho sentir como en mi casa, científica claro. Amelia tus palabras de cariño han sido balsámicas para mi en muchos momentos de esta tesis.

No puedo olvidarme de toda la gente que facilita enormemente nuestro trabajo día a día en el CNB, sin vosotros nuestra precaria ciencia sería aún más difícil. Quiero acordarme de las chicas de la cafetería, Paloma y Carol, que te ponen el café para recuperarte de situaciones extremas; Soco, que es la primera en darme los buenos días a horas intempestivas; los chicos de seguridad liderados por Jesús; las chicas de la recepción, Yolanda y Ana, que tienen que aguantar ahora quiero esta llave ahora quiero la otra; y la gente de compras con el gran Ramón al mando. Mención a parte merecen mi Juan Carlos y mi Antonio porque con vosotros da gusto bajar al almacén. Sí Juan Carlos, Sí, ya se que te debo un montón de perrunas, de chorizo, de morcilla y de todo aquello que me debí traer de mi tierra santa.

Y ahora tengo que agradecer, a la que sin duda alguna ha sido mi mentora, a Doña Dora. Mi primera profesora de Biología, Mi Profesora de Biología, la que un día llegó con su bata blanca y me dijo "mira lo que tengo" y me enseñó a amar la carrera y la profesión que hoy tengo. Tampoco se me olvidará los dos primeros exámenes que me hizo, en el primero discutimos sobre si los virus eran la barrera entre la vida y la muerte, y en el segundo sobre la respuesta inmune innata "primero y no verdaderamente inmunológico...". Quien me iba a decir a mi que tantos años después terminaría estudiando la respuesta innata frente a virus, era mi destino.

Sé que esto va a resultar tremendamente extraño pero hoy tampoco estaría aquí si el 26 de Junio de 2002 Telecinco no hubiese emitido el capítulo 51 de "Hospital Central" llamado "un día cualquiera". Pero no, no fue un día cualquiera, fue el día en que una africana infectada de Ébola llegaba en avión a España. Aquello me marcó, despertó mi pasión por los virus y determinó que me dedicara a la virología, siempre con ese virus en mente. Doce años después, la ficción se convertía en realidad y ponía a ese virus a escasos metros de mi casa... tan cerca pero tan lejos. Jamás pensé que vería a tan imperfecto virus o tan perfecta arma de matar en territorio español. Ojalá hubieran permitido que se quedase y que pudiéramos trabajar con él.

Por último tengo que agradecer a quienes más han sufrido esta tesis, mis padres, mis hermanos y mis abuelos. No debe ser nada fácil ver salir de la casa a un hijo o a un nieto con 17 años y que se vaya cada vez mas lejos y vuelva cada vez menos a casa. Porque como oí el otro día, aunque disfrutáis mis éxitos, esos éxitos conllevan que sufráis mis ausencias. Quiero acordarme de mis tíos y de mis primos, que están siempre esperándome con los brazos abiertos y contando los días que faltan para que vuelva. Y como dice mi hermana, no quiero olvidarme de mis sobrinas perrunas Tara (DEP) y Noa, mi chiquita estuvo acostada encima de mis piernas o a mi lado toda la escritura navideña de esta tesis. Por todo esto,

Agradezco y Dedico esta Tesis a Mi Familia.

A MI FAMILIA

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

2'-5'OAS	2'-5' Oligoadenilato sintetasa
BCoV	Coronavirus bovino
BHK-pAPN	Células de riñón de hámster que expresan la aminopeptidasa N porcina
BSL	Horquilla de gran complejidad o <i>Bulged Stem-Loop</i>
Cap	7-metilguanosina trifosfato
CCL2	MCP1 o proteína quimioatrayente de monocitos 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CoV	Coronavirus
Cp	Ceruloplasmina
CRT	Complejo de replicación-transcripción
CXCL11	IP-9 o proteína 9 inducida por IFN- γ
CXCL9	MIG o monoquina inducida por IFN- γ
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diaminotetraacético
EMSA	Ensayo de ratado de movilidad electroforética
EPRS	Glutamyl-prolil-tRNA sintetasa
ERGIC	Cisternas del compartimento intermedio celular
GAIT	Sistema del inhibidor de traducción inducido por IFN-g
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
gRNA	RNA genómico
GUS- β	Beta-glucuronidasa
HCoV	Coronavirus humano
Hdi	Horas después de la infección
Hdt	Horas después de la transfección
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
Huh-7	Células de hepatocarcinoma humano
HVR	Región hipervariable
IBV	Virus de la bronquitis infecciosa
IFN	Interferón
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
L13a	Proteína ribosomal L13a
MDA-5	Gen-5 asociado a la diferenciación del melanoma
Mdi	Multiplicidad de infección
MERS-CoV	Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio
MHV	Virus de la hepatitis del ratón
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear- κ B
nsp	Proteína no estructural
nt	Nucleótido

p100	Factor transcripcional p100
PABP	Proteína de unión a poliA
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDEV	Virus de la diarrea epidémica porcina
PK	<i>Pseudoknot</i>
PKR	Quinasa dependiente de dsRNA
PLP	Proteasa similar a papaína
PoliA	Cola de poliadeninas
PRCoV	Coronavirus respiratorio porcino
PRR	Receptor celular específico de patógeno
PTB	Proteína de unión a trectos de polipirimidinas
PTV	Aislado del TGEV <i>purdue type virus</i>
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RE	Retículo endoplásmico
RIG-I	Gen I inducible por ácido retinoico
RIP	Inmunoprecipitación de RNA
RLR	Receptores de tipo RIG-I
RNA	Acido Ribonucleico
RRS	Arginil tRNA sintetasa
RT	Reacción de retrotranscripción
RT-PCR	PCR acoplada a transcripción reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa acoplada a la transcripción reversa
rTGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible recombinante
SARS-CoV	Coronavirus responsable del síndrome respiratorio agudo y severo
SCDV	Deltacoronavirus del cerdo
SDS	Dodecilsulfato sódico
sgmRNA	Ácido Ribonucleico mensajero subgenómico
siRNA	RNA pequeño interferente
SL	Estructura a modo de horquilla
ST	Línea celular epitelial de testículo de cerdo
TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta 1
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
tRNA	RNA de transferencia
U937	Células monocíticas humanas
UFP	Unidades formadoras de placas
UTR	Región no traducida
VDM	Vesículas de doble membrana
WB	<i>Western blot</i>

I. ÍNDICE

I. RESUMEN EN INGLÉS.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS	3
1.1. Clasificación taxonómica.....	3
1.2. Enfermedades causadas por CoVs. Importancia sanitaria y socioeconómica	4
1.3. Estructura y composición del virión.....	6
1.4. Estructura del genoma y expresión génica	8
1.5. Ciclo infectivo	10
2. SÍNTESIS DE RNA EN CoV	12
2.1. Transcripción	12
2.2. Replicación	14
2.3. Elementos en <i>cis</i> necesarios para la síntesis de RNA de CoV	14
2.4. Proteínas virales implicadas en síntesis de RNA de CoV	17
2.5. Proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV	21
3. RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A VIRUS	22
3.1. Respuesta antiviral activada por dsRNA	23
3.2. Mecanismos para contrarrestar la respuesta antiviral activada por dsRNA.....	26
4. INFLAMACIÓN	28
III. OBJETIVOS.....	31
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. CÉLULAS EUCARIOTAS	33
1.1. Líneas celulares.....	33
1.2. Cultivo de células eucariotas	33
2. VIRUS.....	34
2.1. Aislados virales.....	34
2.2. Crecimiento y titulación del TGEV	34
2.3. Purificación de viriones del TGEV	34

2.4. Tratamiento con proteasa K de viriones purificados del TGEV	35
3. BACTERIAS	35
3.1. Cepas y cultivos de bacterias	35
3.2. Preparación de bacterias competentes	36
3.3. Transformación de bacterias mediante electroporación	36
4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	36
4.1. Plásmidos de clonaje	36
4.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	37
4.3. Preparación y purificación de DNA.....	37
4.4. Enzimas de restricción y modificación de DNA.....	37
4.5. Amplificación de DNA mediante PCR.....	38
5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA.....	38
5.1. Extracción y purificación de RNA	38
5.2. Análisis de RNA mediante RT-PCR	38
5.3. Cuantificación de RNA mediante RT-PCR cuantitativa	39
5.4. Análisis de la integridad del RNA	40
5.5. Ensayo de inmunoprecipitación de RNA asociado a proteínas	41
5.6. Ensayo de retardo de movilidad electroforética en gel (EMSA).....	42
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	42
6.1. Electroforesis de proteínas	42
6.2. Transferencia electroforética de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	43
6.3. Marcaje metabólico de proteínas	43
7. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE RNA VIRALES QUE INTERACCIONAN CON PROTEÍNAS CELULARES	45
7.1. Síntesis y purificación de los RNAs biotinados utilizados como cebo en la cromatografía de afinidad a RNA.....	45
7.2. Preparación de extractos de proteínas citoplasmáticas utilizados en la cromatografía de afinidad a RNA.....	47

7.3. Cromatografía de afinidad a RNA.....	47
8. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO	
TRADUCCIONAL	48
8.1. Construcción de los plásmidos pTNT-Luc-Cp, pTNT-Luc-TGEV y pTNT-Luc.....	48
8.2. Síntesis y purificación de mRNAs quiméricos de la luciferasa	49
8.3. Preparación de extractos citoplasmáticos de células U937	49
8.4. Traducción in vitro y evaluación de la actividad luciferasa	50
9. GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES DEL TGEV	50
9.1. Construcción de los clones infectivos pBAC-TGEV-mutC y pBAC-TGEV-mutG	50
9.2. Rescate de virus recombinantes a partir de los clones de cDNA infectivos	51
10. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO.....	51
10.1. Efecto del silenciamiento de la RRS sobre la infección por TGEV	51
10.2. Efecto del silenciamiento de MDA5 y RIG-I en la respuesta antiviral frente al TGEV	52
11. ENSAYO DE SENSIBILIDAD A IFN- β	53
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
V. RESULTADOS.....	55
1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON EL EXTREMO 3' DEL GENOMA DEL TGEV	55
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE RNA DEL EXTREMO 3' DEL GENOMA DEL TGEV QUE INTERACCIONAN CON LAS PROTEÍNAS CELULARES.....	58
2.1. Estudio de la implicación de la cola de poliA en la unión de las proteínas celulares al extremo 3' del genoma del TGEV	58
2.2. Localización de los dominios de RNA del extremo 3' del TGEV que interaccionan con proteínas celulares.....	60
2.3. Identificación de los dominios de RNA del genoma del TGEV que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS	63
2.4. Análisis de la secuencia y estructura secundaria del fragmento F2.2L.....	65

3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA EPRS Y LA RRS CON EL MOTIVO DE RNA VIRAL SIMILAR AL ELEMENTO GAIT	67
3.1. Análisis <i>in vitro</i> de la interacción de las proteínas EPRS y RRS con el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT.....	67
3.2. Análisis de la interacción de las proteínas EPRS y RRS con el RNA viral durante la infección	68
3.3. Estudio de la incorporación de las aminoacil tRNA sintetasas EPRS y RRS en la partícula viral.....	69
4. ANÁLISIS FUNCIONAL <i>IN VITRO</i> DEL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT DEL TGEV	71
5. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES DEL TGEV CON MUTACIONES EN EL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT.....	73
5.1. Diseño de mutantes del motivo de RNA similar al elemento GAIT y caracterización <i>in vitro</i> de su interacción con las proteínas EPRS y RRS	73
5.2. Construcción de los virus recombinantes rTGEV-mutC y rTGEV-mutG.....	75
5.3. Caracterización de los virus rTGEV-mutC y rTGEV-mutG en cultivos celulares	75
6. RELEVANCIA DEL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INNATA INMUNE	78
7. ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA AFECTADA POR EL MOTIVO DE RNA VIRAL SIMILAR AL ELEMENTO GAIT	82
7.1 Efecto del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT sobre la vía de señalización mediada por la 2'-5'OAS.....	82
7.2 Efecto del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT sobre la vía de señalización mediada por la PKR	83
7.3. Efecto del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT sobre la vía de señalización mediada por los RLRs	84
VI. DISCUSIÓN	91
1. ESTUDIO DE PROTEÍNAS CELULARES IMPLICAS EN LA REPLICACIÓN DE CoV	91

2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MOTIVO DE RNA QUE INTERACCIONA CON LAS PROTEÍNAS CELULARES EPRS Y RRS	93
3. ESTUDIO DEL PAPEL DEL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA	95
VII. CONCLUSIONES	99
VIII. BIBLIOGRAFÍA	101
IX. ANEXO	

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Taxonomía del orden <i>Nidovirales</i>	3
2. Estructura del virión del TGEV.....	7
3. Expresión génica del TGEV.....	10
4. Ciclo infectivo de CoVs	11
5. Modelo de transcripción de CoV.....	13
6. Dominios de RNA en los extremos del genoma de los CoVs.....	17
7. Organización y procesamiento proteolítico de la replicasa del TGEV.....	18
8. Respuesta antiviral activada por dsRNA.....	25
9. Antagonistas de CoVs frente a la respuesta antiviral activada por dsRNA.....	27
10. Sistema GAIT	29
11. Análisis del efecto del silenciamiento de la expresión de las proteínas p100 y RRS en la infección viral.....	57
12. Esquema de la cromatografía de afinidad a RNA.....	59
13. Relevancia de la cola de poliA en la unión de las proteínas celulares a extremo 3' del genoma del TGEV.....	60
14. Mapeo de los dominios de RNA del extremo 3' que interaccionan con las proteínas celulares.....	62
15. Mapeo de los dominios de RNA del fragmento F2 que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS	64
16. Mapeo de los dominios de RNA del fragmento F2 que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS.....	65
17. Análisis de la secuencia del fragmento F2.2L	66
18. Análisis de la interacción entre la EPRS y el motivo de RNA similar al elemento GAIT mediante EMSA	68
19. Análisis de la interacción de la EPRS y la RRS con los RNAs virales mediante inmunoprecipitación de RNA asociada a proteína.....	69
20. Identificación de las proteínas celulares EPRS y RRS en viriones purificados del TGEV	70
21. Análisis <i>in vitro</i> de la inhibición de la traducción mediada por el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT	72

22. Diseño y caracterización <i>in vitro</i> de los mutantes del motivo de RNA similar al elemento GAIT	74
23. Morfología y tamaño de las placas de lisis producidas por los virus rTGEV-wt, rTGEV-mutC y rTGEV-mutG	75
24. Cinética de crecimiento de los virus mutantes y parental	76
25. Análisis de la síntesis de RNA viral de los virus mutantes y parental	77
26. Ensayo de competición entre el virus parental y los virus mutantes	78
27. Cinética de expresión de citoquinas proinflamatorias durante la infección por TGEV	80
28. Cinética de expresión del IFN- β , MDA5 y RIG-I durante la infección por TGEV	81
29. Análisis de la integridad del RNA durante la infección por TGEV	83
30. Análisis de la síntesis de proteínas durante la infección por TGEV	84
31. Efecto del silenciamiento de MDA5 y RIG-I en la producción de TNF e IFN- β durante las infecciones con rTGEV-wt y rTGEV-mutG	87
32. Sensibilidad a IFN- β de los virus rTGEV-wt y rTGEV-mutG	89
33. Conservación del motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV en otros CoVs	97

ÍNDICE DE TABLAS

I. Géneros y especies de la subfamilia Coronaviridae	5
II. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de RNAs virales mediante RT-qPCR	40
III. Ensayos TaqMan utilizados para el análisis de genes celulares por RT-qPCR	41
IV. Anticuerpos utilizados en este trabajo	44
V. Oligonucleótidos utilizados para la generación de moldes de DNA para transcripción	45
VI. RNAs biotinados sintetizados químicamente	47
VII. siRNAs utilizados en este trabajo	53

I. RESUMEN EN INGLÉS

Coronaviruses (CoVs) are enveloped, positive-sense RNA viruses that belong to the order *Nidovirales*, causing respiratory and enteric infections in a wide range of animals and human. CoV replication and transcription take place at cytoplasmic double membrane vesicles and is mediated by the viral replicase. These processes require the specific recognition of RNA *cis*-acting signals located at the ends of the viral genome. Similarly to many other RNA viruses, the virus-encoded replication complex presumably associates with host-cell proteins to complete the synthesis of viral RNA. Using transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) as a model, we previously identified nine cellular proteins interacting with the genome 3' end, including the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) A0, A1, A2/B1, Q and U, the translational factors glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS), arginyl-tRNA synthetase (RRS) and poly(A)-binding protein (PABP), and the p100 transcriptional coactivator. From these proteins, a functional role on viral RNA synthesis was reported for hnRNP Q, EPRS and PABP. In this thesis, the functional study was extended to the proteins RRS and p100, and a positive role of both cell proteins in the viral RNA synthesis was demonstrated by silencing analysis.

The RNA domains interacting with the cell proteins involved in TGEV RNA synthesis were further analyzed to study their mechanisms of action. After several RNA mapping stages, a 32-nt RNA motif located at the 3' end of the TGEV genome was found to specifically interact with EPRS and RRS. This interaction was also observed during the infection, where both tRNA synthetases specifically interacted with the viral genomic and subgenomic RNAs. Interestingly, both aminoacyl tRNA synthetases were incorporated into the viral particle, possibly through their interaction with the viral genome RNA. This RNA motif presented high homology in sequence and secondary structure with the gamma interferon activated inhibitor of translation (GAIT) element, which is present at the 3' end of several mRNAs coding proinflammatory proteins. The GAIT element is involved in the translation silencing of these mRNAs through its interaction with the GAIT complex [EPRS, hnRNP Q, L13a, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)] to favor the resolution of inflammation. Similarly to the cellular GAIT element, the viral RNA domain was able to bind the GAIT complex and inhibit the *in vitro* translation of a chimeric mRNA

containing this motif, suggesting that the viral RNA domain could constitute the first GAIT-like motif described in a positive RNA virus.

To test the functional role of the GAIT-like motif in TGEV infection, two recombinant viruses harboring mutations in this motif were engineered and characterized. Abrogation of the GAIT-like motif did not affect virus growth in cell cultures. However, an exacerbated innate immune response, mediated by the melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) pathway, was observed in cells infected with the mutant viruses compared with the parental virus infection. Furthermore, mutant viruses were more sensitive to interferon beta than the parental virus. Altogether, these data suggested that the GAIT-like motif modulates the host innate immune response.

II. INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS

1.1. Clasificación taxonómica

Los Coronavirus (CoVs) son virus con envuelta y un genoma de RNA no segmentado de cadena sencilla y polaridad positiva. Los CoVs pertenecen a la familia *Coronaviridae*, que junto a las familias *Arteriviridae*, *Roniviridae* y *Mesoniviridae* constituyen el orden *Nidovirales* (del latín *Nidus*, nido) (Fig. 1), el cual se caracteriza por la generación de mRNAs 3' coterminales o anidados (Enjuanes y col., 2008; Carstens, 2010; de Groot y col., 2011). La familia *Coronaviridae* engloba a su vez a las subfamilias *Torovirinae*, formada por los géneros *Torovirus* y *Bafinivirus*, y *Coronavirinae*, constituida por los géneros *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* (α , β , γ y δ , respectivamente) (de Groot y col., 2011). Los miembros de ambas subfamilias presentan una organización genómica y una estrategia de replicación similar, pero difieren en la longitud del genoma y en la estructura del virión (Fig. 1).

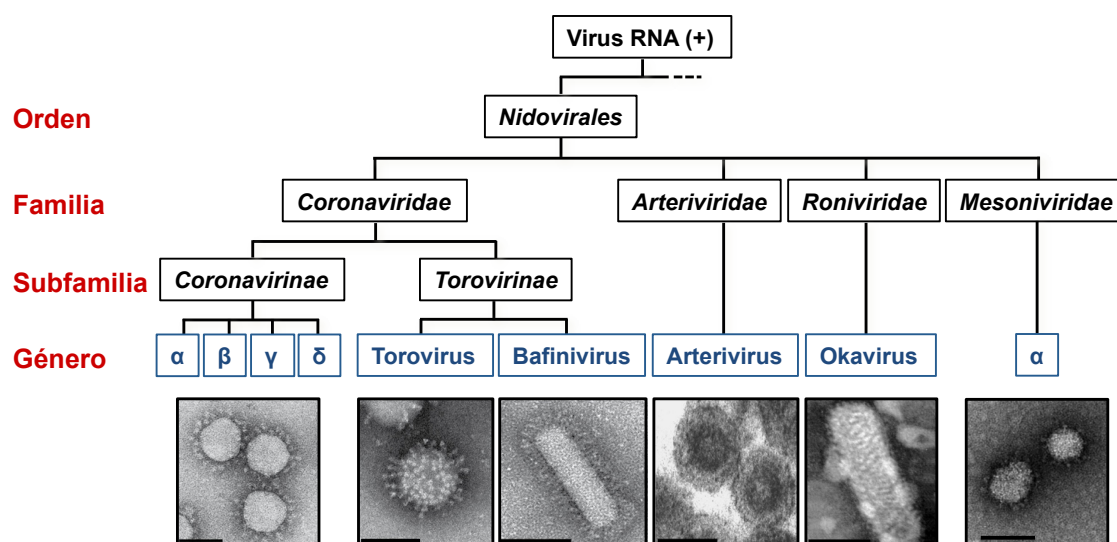


Figura 1. Taxonomía del orden *Nidovirales*. Se muestran las familias, subfamilias y géneros del orden *Nidovirales*, junto con micrografías electrónicas representativas de cada género. Barra, 50 nm.

1.2. Enfermedades causadas por CoVs. Importancia sanitaria y socioeconómica

Los CoVs de los géneros α y β infectan a mamíferos, incluido el hombre, los del género γ a aves y los del género δ tanto a mamíferos como a aves, causando principalmente enfermedades respiratorias y gastrointestinales de gran relevancia en salud humana y animal, aunque en algunos casos también son responsables de afecciones hepáticas, cardíacas, oculares y del sistema nervioso (Perlman y col., 2000; Masters, 2006; Li y col., 2014) (Tabla I).

Históricamente, la infección por CoVs en humanos ha estado asociada a los resfriados comunes, causados fundamentalmente por los CoVs humanos (HCoVs) HCoV-229E y HCoV-OC43 (Masters, 2006). Sin embargo, la emergencia en 2002 del CoV responsable del síndrome respiratorio agudo y severo (SARS-CoV), que infectó a más de 8000 personas de 32 países con una mortalidad cercana al 10%, cambió profundamente la percepción histórica de los CoVs (Drosten y col., 2003; Rota y col., 2003; Stadler y col., 2003). A partir de este momento, los CoVs adquirieron gran relevancia y se intensificaron los programas de vigilancia médica, identificándose dos nuevos CoVs humanos, el HCoV-HKU1 y el HCoV-NL63, como los agentes responsables de numerosos casos de bronquitis y neumonías relativamente graves en niños y adultos (van der Hoek y col., 2004; Woo y col., 2005). Finalmente, la reciente emergencia en 2012 del CoV causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Zaki y col., 2012), ha potenciado aún más la relevancia de los CoVs como patógenos humanos importantes, incrementándose su estudio con el fin de desarrollar terapias efectivas.

En animales, los CoVs son responsables de enfermedades de gran importancia en explotaciones ganaderas (CoV porcinos, bovinos y aviares), en animales de compañía (CoVs caninos y felinos) y en animales de experimentación (CoVs murinos) (Cavanagh, 2005; Lai y col., 2007; Perlman y Netland, 2009). Entre estos, el *Deltacoronavirus* del cerdo (SCDV), el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), han causado y siguen causando graves daños en la cabaña porcina mundial (Saif y Wesley, 1992; Song y Park, 2012; Huang y col., 2013; Li y col., 2014; Marthaler y col., 2014). El TGEV, modelo de estudio de esta tesis doctoral, es un *Alfacoronavirus* que produce una enteritis

muy contagiosa en lechones recién nacidos, con una tasa de mortalidad cercana al 100% (Saif y Wesley, 1992). La enfermedad se describió por primera vez en EEUU (Doyle y Hutchings, 1946) y desde entonces se ha identificado en numerosos países europeos, en América Central y del Sur, en Canadá y en diversos países asiáticos.

Tabla I. Géneros y especies de la subfamilia *Coronaviridae*

Género	Especie	Designación ^(a)	Hospedador	Enfermedad
α	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible	TGEV	Cerdo	Enteritis
	CoV respiratorio porcino	PRCoV	Cerdo	Respiratoria
	Virus de la peritonitis infecciosa felina	FIPV	Gato	Peritonitis
	CoV canino	CCoV	Perro	Enteritis
	CoV humano 229E	HCoV-229E	Humano	Respiratoria
	Virus de la diarrea epidémica porcina	PEDV	Cerdo	Enteritis
	CoV humano NL63	HCoV-NL63	Humano	Neumonía
	CoV felino	FCoV	Gato	Peritonitis
	CoV de murciélago HKU2	BatCoV-HKU2	Murciélago	Asintomático
	CoV de murciélago 512	BatCoV-512	Murciélago	Asintomático
	CoV de murciélago HKU8	BatCoV-HKU8	Murciélago	Asintomático
β	Virus de la hepatitis de ratón	MHV	Ratón	Hepatitis
	CoV humano OC43	HCoV-OC43	Humano	Enteritis
	CoV del SARS	SARS-CoV	Humano	Neumonía
	CoV del MERS	MERS-CoV	Humano	Neumonía Nefritis
	CoV bovino	BCoV	Vaca	Enteritis
	Virus de la encefalitis hemaglutinante porcina	HEV	Cerdo	Encefalitis
	CoV de la rata	RCoV	Rata	Respiratoria
	Virus de la sialodacrioadenitis	SDVA	Rata	Adenitis
	CoV equino	ECoV	Caballo	Enteritis
	CoV humano HKU1	HCoV-HKU1	Humano	Neumonía
	CoV de murciélago HKU3	BatCoV-HKU3	Murciélago	Asintomático
	CoV de murciélago HKU5	BatCoV-HKU5	Murciélago	Asintomático
	CoV de murciélago HKU9	BatCoV-HKU8	Murciélago	Asintomático
γ	Virus de la bronquitis infecciosa	IBV	Pollo	Respiratoria
	CoV del pavo	TCoV	Pavo	Nefritis
	CoV de la ballena Beluga SW1	BWCoV-SW1	Beluga	Desconocido
δ	CoV del Bulbul HKU11	BuCoV HKU1	Pájaro	Desconocido
	CoV del Munia HKU13	MuCoV HKU13	Pájaro	Desconocido
	CoV del Cerdo HKU15	PorCoV HKU15	Cerdo	Enteritis

(a) En esta memoria se utiliza la nomenclatura de la subfamilia *Coronaviridae* del noveno informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Carstens, 2010).

Actualmente, la mayor parte de ganado porcino europeo presenta inmunidad parcial frente al TGEV (Enjuanes y Van der Zeijst, 1995; Pensaert y Van Reeth, 1998) debido a la diseminación de un mutante natural atenuado, el CoV respiratorio porcino (PRCoV), el cual no produce síntomas clínicos. En otros países la diseminación del PRCoV no parece haber sido tan efectiva como en Europa (Woods y Wesley, 1998) y la enfermedad continúa siendo un problema económico para los productores de ganado porcino, particularmente en cabañas porcinas seronegativas de EEUU, América del Sur, Rusia y China.

Desde la emergencia del SARS-CoV, uno de los retos más importantes de los coronavirólogos ha sido la identificación del reservorio zoonótico de los CoVs. Como consecuencia de estos estudios, en los últimos 10 años se han descrito al menos 60 CoVs que infectan murciélagos, muchos de los cuales son antecesores comunes recientes de los CoVs de los géneros α y β , incluyendo CoVs muy similares al SARS-CoV y al MERS-CoV (Dominguez y col., 2007; Woo y col., 2007; Decroly y col., 2008; Gloza-Rausch y col., 2008; Tong y col., 2009; Annan y col., 2013; Graham y col., 2013). Actualmente, todos los datos obtenidos sugieren que los murciélagos constituyen el reservorio natural de los CoVs. Este hecho, junto con las recientes emergencias del SARS-CoV y el MERS-CoV, reflejan la facilidad de los CoV para transmitirse a nuevas especies, entre ellas los humanos, y su gran potencial para adaptarse rápidamente a éstas (Graham y col., 2013).

1.3. Estructura y composición del virión

Los CoVs son virus esféricos con un diámetro de 100-160 nm que presentan dos niveles estructurales bien definidos. El primer nivel estructural consiste en una envuelta lipídica donde se encuentran integradas las proteínas estructurales S, M y E, comunes a todos los CoVs, junto a otras proteínas exclusivas de especie. En el interior del virión aparece un segundo nivel estructural constituido por una nucleocápsida helicoidal formada por el genoma viral asociado a la proteína N (Fig. 2).

La proteína S, o proteína de las espículas, es una glicoproteína de membrana de tipo I de 150 a 200 kDa. Es la proteína más prominente de la envuelta viral y se ensambla formando trímeros que constituyen las espículas o peplómeros que

confieren a la superficie del virión la forma de corona característica de los CoVs (Delmas y Laude, 1990). La proteína S media la unión con el receptor celular y la fusión entre las membranas del virus y la célula hospedadora, facilitando la entrada del virus en las células, es la proteína responsable de la especificidad de tejido y especie, y la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (Jiménez y col., 1986; Sánchez y col., 1999; Gallagher y Buchmeier, 2001).

La proteína M, o proteína de membrana, es el componente estructural más abundante del virión (Sturman y Holmes, 1977; Sturman y col., 1980) y está implicada en los procesos de morfogénesis y ensamblaje viral (Nguyen y Hogue, 1997). Es una glicoproteína de unos 29 a 36 kDa, formada por un pequeño segmento N-terminal situado hacia el exterior de la partícula viral, tres dominios transmembrana y un extremo C-terminal orientado hacia el interior del virión que interacciona con la proteína N. En el caso específico del TGEV, la proteína M presenta una segunda topología (M') en donde ambos extremos aparecen orientados hacia el exterior de la partícula viral (Fig. 2) (Escors y col., 2001).

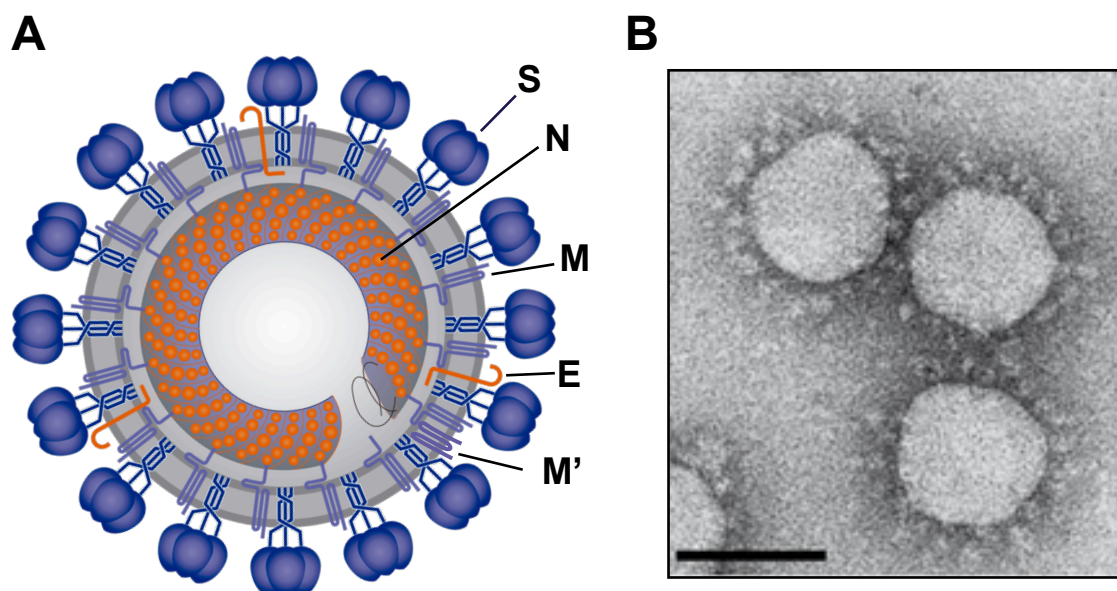


Figura 2. Estructura del virión del TGEV. (A) Modelo estructural de la partícula viral. Se muestran los niveles estructurales que la conforman, la envuelta lipídica en la que se integran las proteínas S, E y M (en dos conformaciones M y M') y la nucleocápsida helicoidal formada por el genoma RNA asociado a proteína N. **(B)** Micrografía electrónica de viriones purificados. Se observan los peplómeros formados por la proteína S, que dan al virus un aspecto de corona. Barra, 50 nm.

La proteína E, o de la envuelta, es una proteína integral de membrana de unos 10 kDa que aparece en cantidades minoritarias en la envuelta viral. En la célula infectada es una de las proteínas virales más abundantes y junto con la proteína M está implicada en el ensamblaje y morfogénesis viral (Ortego y col., 2002; Kuo y Masters, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la proteína E forma canales iónicos (Verdia-Baguena y col., 2012; Verdia-Baguena y col., 2013) y es un factor de virulencia que modula la respuesta celular a estrés de retículo y la inflamación (DeDiego y col., 2011; Jiménez-Guardeño y col., 2014; Nieto-Torres y col., 2014).

Además de las proteínas S, M y E, algunos CoVs del género β presentan en la envuelta viral otras proteínas específicas de especie, como una proteína con homología a la hemaglutinina en el caso del virus de la hepatitis de ratón (MHV) (King y col., 1985; Brian y Baric, 2005) o las proteínas accesorias 3a, 6, 7a y 7b en el caso del SARS-CoV (Ito y col., 2005; Shen y col., 2005; Huang y col., 2006; Huang y col., 2007; Schaecher y col., 2007), cuyo papel en el ciclo viral se conoce sólo parcialmente.

La proteína N, o nucleoproteína, es una fosfoproteína de unos 40 kDa que se une al RNA genómico (gRNA) viral para formar la nucleocápsida helicoidal. Además de su papel estructural, la proteína N juega un papel fundamental en la síntesis de RNA virales, posiblemente a través de su actividad chaperona de RNA (Thiel y col., 2003; Almazán y col., 2004; Schelle y col., 2005; Zúñiga y col., 2007; Zúñiga y col., 2010), y actúa como un antagonista de la respuesta antiviral mediada por interferón (IFN) de tipo I (Ye y col., 2007; Lu y col., 2011).

1.4. Estructura del genoma y expresión génica

El genoma de los CoVs consiste en una molécula de RNA no segmentado, de cadena sencilla y polaridad positiva con un tamaño que varía entre 28 y 30 kb, representando el genoma viral de RNA de mayor tamaño conocido (Enjuanes y col., 2008; de Groot y col., 2011). Estructuralmente, se asemeja a los mRNAs celulares ya que posee una estructura cap en el extremo 5' (Page y col., 1990), una cola de poliA en el extremo 3' (Jacobs y col., 1986) y regiones no traducidas en ambos extremos (5' UTR y 3' UTR). A diferencia de los mRNAs celulares, el genoma de los CoVs es

policistrónico y presenta una secuencia líder en el extremo 5' que es esencial en la replicación y transcripción del genoma viral (Fig. 3).

Aproximadamente, los dos primeros tercios del genoma están ocupados por el gen de la replicasa, el cual está formado por dos fases de lectura abierta solapantes (ORF 1a y ORF 1b) que se traducen directamente desde el gRNA al inicio de la infección dando lugar a dos poliproteínas co-amino terminales denominadas pp1a y pp1ab (Fig. 3). La pp1ab se traduce mediante un salto de fase del ribosoma (Brierley y col., 1989) que tiene lugar en la región de solapamiento de las dos ORFs, el cual permite evitar el codón de terminación de la ORF 1a y continuar la traducción dentro de la ORF 1b. Ambas poliproteínas se autoprocesan proteolíticamente dando lugar a 16 proteínas no estructurales (nsps) que junto con la proteína N y la posible participación de proteínas celulares formarán el complejo de replicación-transcripción (CRT) (Ziebuhr y col., 2000; Ziebuhr, 2005; Enjuanes y col., 2006a; Masters, 2006).

El tercio final del genoma viral contiene los genes estructurales S, E, M y N, y un grupo de genes accesorios o específicos de especie cuyo número y posición en el genoma varía entre las distintas especies del CoV (Masters, 2006; Carstens, 2010; de Groot y col., 2011). En el caso del TGEV existen tres genes accesorios, los genes 3a y 3b que se localizan entre los genes S y E y el gen 7 que se localiza después del gen N (Fig. 3). Los genes 3a y 3b son dispensables para la replicación del virus *in vitro* e *in vivo* y se desconoce su posible función en virulencia (Vaughn y col., 1995; Curtis y col., 2004), mientras que el gen 7 es un factor de virulencia que contrarresta la respuesta antiviral del huésped mediante su asociación con la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa I (PP1c) (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013). A diferencia del gen de la replicasa, los genes estructurales y accesorios se expresan a partir de una colección de mRNAs subgenómicos (sgmRNAs) 5' y 3' coterminales, los cuales incluyen en el extremo 5' la secuencia líder que está presente en el genoma viral (Fig. 3) (Masters, 2006). Esta secuencia, que en el caso del TGEV es de 99 nt, se incorpora a los sgmRNAs mediante un proceso de síntesis discontinua dirigido por las secuencias reguladoras de la transcripción (TRSs) que se localizan en el genoma viral al final de la secuencia líder y precediendo a cada uno de los genes del extremo 3' (Zúñiga y col., 2004; Sola y col., 2005; Enjuanes y col., 2006b). A pesar de que los sgmRNAs

generados son policistrónicos, por lo general, sólo se traduce la ORF situada más próxima al extremo 5'.

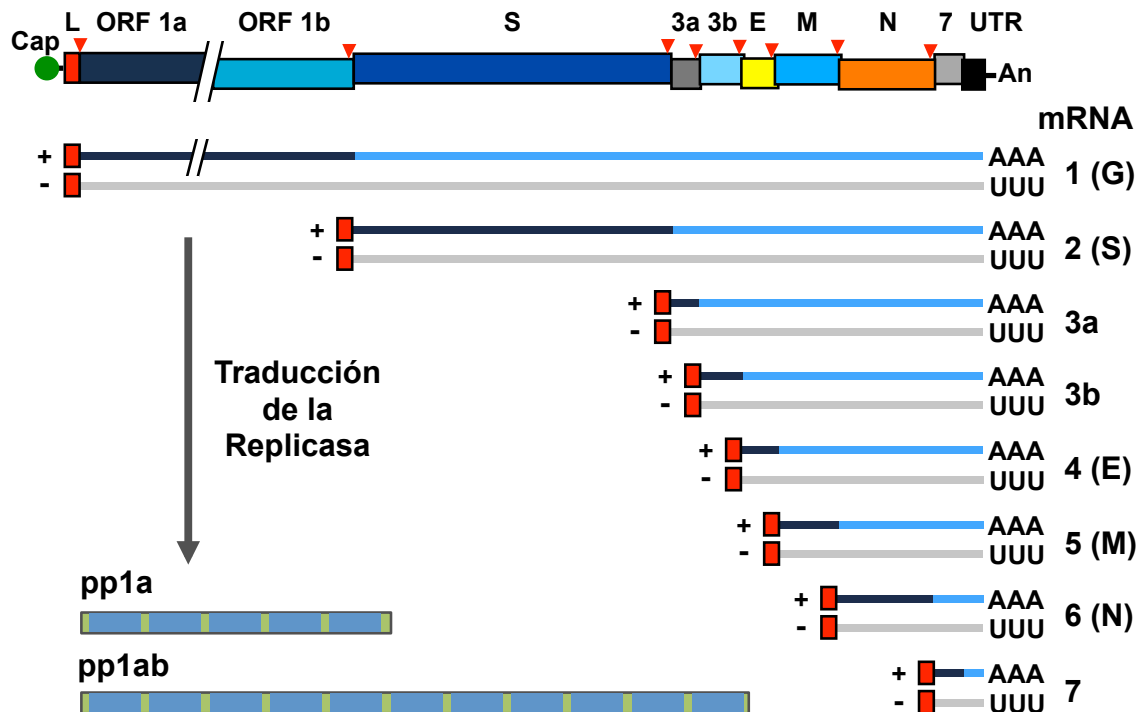


Figura 3. Expresión génica del TGEV. En la parte superior se muestra el esquema del genoma del TGEV, la estructura cap, la secuencia líder (L), los genes virales (ORF1a, ORF1b, S, 3a, 3b, E, M, N, 7), la región 3' no traducida (UTR), el poliA (An) y las TRS (triángulos rojos). En la parte central se muestran los RNAs virales resultantes de la transcripción, numerados por tamaño del 1 al 7, indicándose su polaridad y estructuras terminales comunes. Las secuencias líder y antilíder se muestran en rojo y la secuencia codificante traducida a partir de cada mensajero policistrónico en azul oscuro. En la parte inferior se muestran las poliproteínas de la replicasa sin procesar.

1.5. Ciclo infectivo

El ciclo infectivo de los CoVs (Fig. 4) comienza con la unión de la proteína S del virión al receptor celular, que en el caso de TGEV es la aminopeptidasa N porcina (pAPN) (Delmas y col., 1992), promoviendo la internalización del virus. Después de la entrada del virus se produce el desensablaje del virión y la liberación del genoma viral al citoplasma, donde es traducido dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab. Ambas poliproteínas son autoprocésadas por 3 proteasas virales generando 16 nsps que junto con la proteína N y la posible participación de proteínas celulares constituyen el CRT, el cual se ensambla en unas vesículas citoplasmáticas de doble

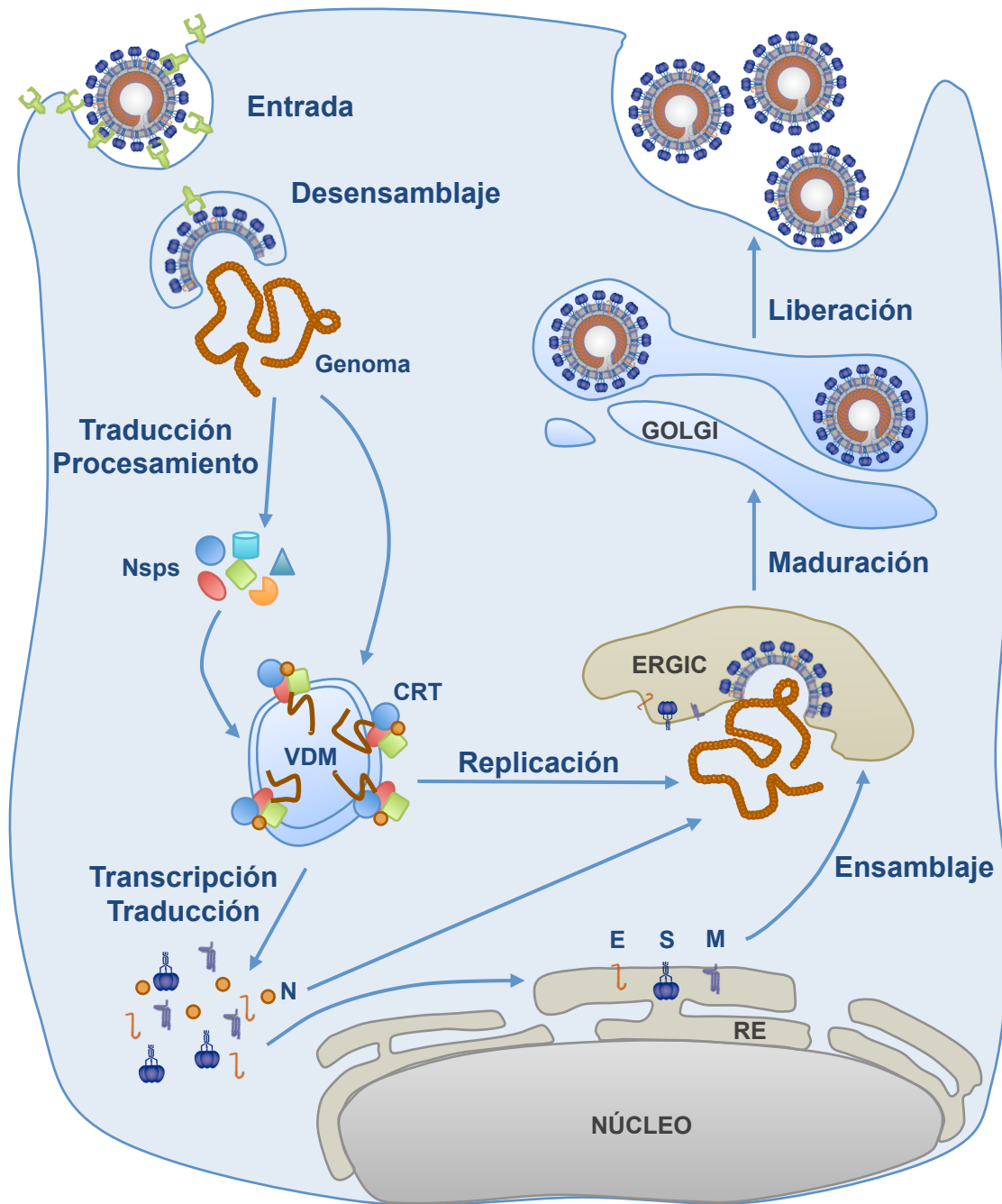


Figura 4. Ciclo infeccioso de CoVs. Se muestra un esquema de la infección por el TGEV en la que se indican las diferentes fases del ciclo infeccioso. Nsps, proteínas no estructurales del gen de la replicasa; VDM, vesículas de doble membrana; CRT, complejo de replicación-transcripción; RE, retículo endoplásmico; ERGIC, compartimento intermedio; GOLGI, complejo de Golgi.

membrana (VDM) interconectadas con el retículo endoplásmico (RE). En estas estructuras tiene lugar la síntesis de los genomas progenie (replicación) y de los sgRNAs (transcripción) utilizando como molde el genoma entrante (Sawicki y Sawicki, 1990; Gosert y col., 2002; Enjuanes y col., 2006a; Masters, 2006; Snijder y col.,

2006; Sawicki y col., 2007; Knoops y col., 2008; Galán y col., 2009). Posteriormente, los sgRNAs se traducen dando lugar a las proteínas estructurales y accesorias del extremo 3' del genoma. Las proteínas de la envuelta S, M y E se incorporan en la membrana del RE y se translocan a las cisternas del compartimento intermedio celular (ERGIC) (Tooze y col., 1984; Stertz y col., 2007). Paralelamente, la proteína N se asocia con los nuevos genomas progenie formando las nucleocápsidas helicoidales, las cuales se asocian con los componentes estructurales virales integrados en el ERGIC. Este proceso está mediado por la interacción de la proteína N con el dominio C-terminal de la proteína M y conduce a la invaginación de la membrana del ERGIC entorno a las nucleocápsidas dando lugar a la formación de los viriones inmaduros (Sturman y col., 1980; Narayanan y Makino, 2001). Los viriones se acumulan en vesículas y maduran durante su tránsito a través del Golgi (Salanueva y col., 1999). Finalmente, las vesículas cargadas con los viriones ya maduros se fusionan con la membrana plasmática liberando la progenie viral al medio extracelular. En algunos CoVs, una fracción de la proteína S se incorpora en la membrana plasmática donde media la fusión de la célula infectada con otra adyacente no infectada dando lugar a la formación de sincitios multinucleados (Masters, 2006).

2. SÍNTESIS DE RNA EN CoV

La síntesis de RNA en CoV incluye dos procesos coordinados claramente diferenciados, la replicación del genoma viral y la transcripción de los sgRNAs. Ambos procesos son llevados a cabo por el CRT en las VDMs y requieren el reconocimiento específico de elementos de RNA en *cis* localizados en ambos extremos del genoma (Brian y Baric, 2005; Enjuanes y col., 2006a; Galán y col., 2009; Sola y col., 2011b). Tanto en la replicación como en la transcripción se utiliza la misma molécula molde, el gRNA de polaridad positiva, por lo que deben de existir mecanismos de control de tipo espacial y temporal que regulen ambos procesos.

2.1. Transcripción

En CoVs el proceso de transcripción está dirigido por las TRSs, formadas por un hexanucleótido central conservado (CS), cuya secuencia varía dependiendo de la especie de CoV, flanqueado por secuencias de longitud variable denominadas 5' y 3'

TRSs (Fig. 5) (van Marle y col., 1999; Baric y Yount, 2000; Pasternak y col., 2001; Zúñiga y col., 2004; Sola y col., 2005). Según el modelo actualmente aceptado, el proceso de transcripción se iniciaría copiando el extremo 3' del genoma hasta alcanzar las distintas TRSs que preceden a cada gen (TRS-B), las cuales actuarían como señales de parada para la polimerasa viral. Una vez copiada la CS de la TRS del gen correspondiente (CS-B), se produciría un cambio de molde y el apareamiento de la TRS-B de la cadena negativa naciente con la TRS del líder (TRS-L). Finalmente, la secuencia del líder se copiaría para generar los sgmrnas de polaridad negativa que

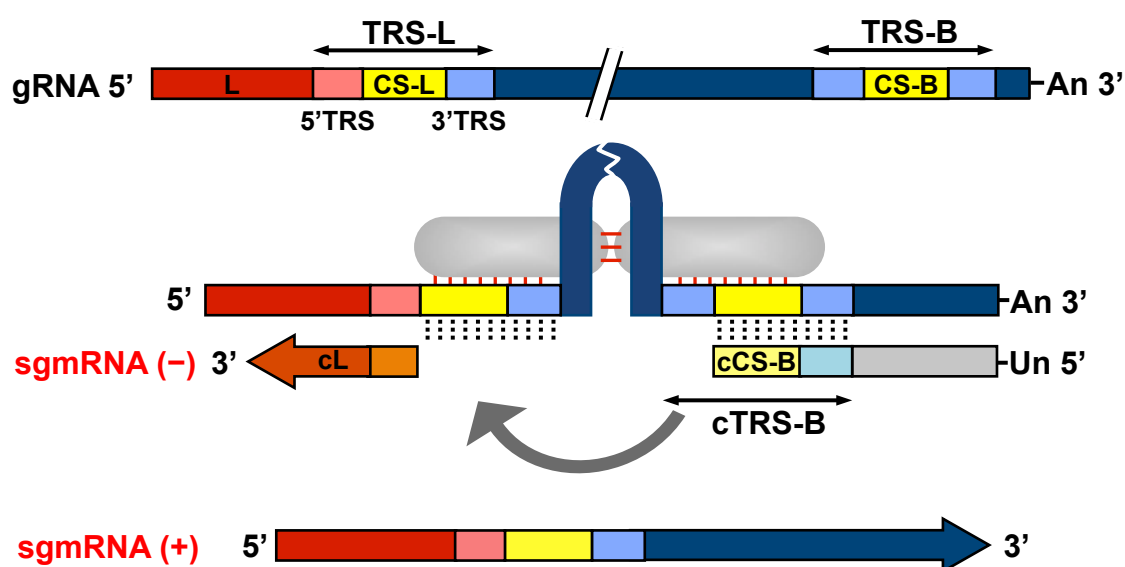


Figura 5. Modelo de transcripción de CoV. El RNA genómico (gRNA) y subgenómico (sgmrna) de polaridad positiva (+) se muestran con una barra de color azul oscuro, donde se indican la secuencia líder (L) en rojo y las TRS del líder (TRS-L) y de los genes (TRS-B) en amarillo. La línea curva discontinua representa el plegamiento propuesto que permite la aproximación de secuencias alejadas del genoma, el cual parece estar mediado por interacciones RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína (globalmente representado como óvalos grises). El sgmrna de polaridad negativa (-) se muestra con una barra de color gris, donde se indican las secuencias complementarias del líder (cL) en color naranja oscuro y de las TRS de los genes (cTRS-B) en amarillo claro.

servirían de molde para la síntesis asimétrica de los sgmrnas de polaridad positiva (Fig. 5). Este mecanismo de transcripción implica la aproximación en el espacio de regiones distales del genoma, posiblemente mediada por interacciones RNA-RNA, RNA-proteína y proteína-proteína (Fig. 5) (Curtis y col., 2004; Zúñiga y col., 2004; Sola y col., 2005; Enjuanes y col., 2006b; Yount y col., 2006).

2.2. Replicación

A diferencia del mecanismo de transcripción, la replicación del genoma viral es un proceso continuo que comienza con la síntesis de un intermediario de RNA de longitud completa y polaridad negativa que actúa como molde para la síntesis asimétrica de nuevas copias del genoma de polaridad positiva (Brian y Baric, 2005). Se conoce muy poco acerca de las bases moleculares de este proceso y la mayor parte de los estudios que se han realizado se han llevado a cabo utilizando RNAs defectivos o minigenomas, los cuales conservan los elementos de RNA en *cis* necesarios para su replicación en *trans* por un virus complementador. Utilizando minigenomas de varios CoVs pertenecientes a los géneros α , β y γ , se ha determinado que en todos los casos las secuencias mínimas necesarias para la replicación residen en los extremos 5' y 3' del genoma, variando su extensión en función del CoV estudiado (revisado en Sola y col., 2011b). En el caso del TGEV, son necesarios los primeros 649 nt del extremo 5' (Escors y col., 2003) y los últimos 492 del extremo 3' más el poliA (Izeta y col., 1999). A pesar de la utilidad de los minigenomas para llevar a cabo este tipo de estudios, estos presentan serias limitaciones dada la alta tasa de recombinación observada entre estos RNAs defectivos y el virus complementador. Actualmente, la disponibilidad de clones infectivos y replicones de CoVs (revisado en Almazán y col., 2014) permite resolver estas limitaciones y estudiar aspectos fundamentales de la replicación de CoV como los elementos de RNA en *cis* necesarios para replicación, la composición exacta del CRT, los mecanismos moleculares que regulan la síntesis asimétrica del RNA de polaridad negativa y positiva, y el mecanismo que regula el paso de replicación a transcripción.

2.3. Elementos en *cis* necesarios para la síntesis de RNA de CoV

Tanto la replicación como la transcripción del genoma de los CoVs requieren el reconocimiento específico de elementos de RNA en *cis* del genoma viral. La identificación y el estudio funcional de estos elementos se realizaron inicialmente utilizando minigenomas y posteriormente, estos estudios se extendieron a nivel del genoma completo mediante genética reversa utilizando clones infectivos y replicones. Estos estudios se han realizado fundamentalmente en CoVs del género β ,

y en una menor extensión en CoVs de los géneros α y γ , utilizando una combinación de métodos bioinformáticos, estructurales, bioquímicos y genéticos. Al igual que en otros virus RNA de polaridad positiva, en CoVs, los elementos de RNA en *cis* necesarios para la síntesis de RNA consisten en estructuras de RNA altamente estructuradas localizadas en las 5' y 3' UTRs aunque, en algunos casos, estas se extienden dentro de las secuencias codificantes adyacentes (Fig. 6) (revisado en Masters, 2006; Sola y col., 2011b; Madhugiri y col., 2014).

La identificación y caracterización funcional de estas estructuras en el extremo 5' del genoma se realizó inicialmente con el CoV bovino (BCoV) perteneciente al género β (Chang y col., 1994; Chang y col., 1996; Raman y col., 2003; Raman y Brian, 2005; Brown y col., 2007; Gustin y col., 2009). Recientemente, estos estudios se han extendido a otros CoVs del género β y a algunos de los géneros α y γ , identificándose 5 estructuras a modo de horquilla (SL1, SL2, SL3, SL4 y SL5) con un grado de conservación variable entre los distintos CoVs analizados (Fig. 6) (Kang y col., 2006; Chen y Olsthoorn, 2010; Sola y col., 2011b; Madhugiri y col., 2014). Las horquillas SL1 y SL2 están muy conservadas en todos los CoVs y se han implicado tanto en la replicación del genoma viral como en la síntesis de los sgRNAs (Li y col., 2008; Liu y col., 2009; Lee y col., 2011). La horquilla SL3, que contiene la CS del líder, presenta una energía libre muy baja y en muchos de los CoVs analizados parece no estar estructurada (Kang y col., 2006; Liu y col., 2007; Chen y Olsthoorn, 2010; Madhugiri y col., 2014). A continuación de la CS del líder se encuentra una horquilla de mayor tamaño denominada SL4. Esta estructura está muy conservada en todos los géneros de CoVs y se ha propuesto que actúa como un elemento espaciador que controla la orientación de los SLs que la preceden, dirigiendo de este modo la síntesis de los sgRNAs (Raman y col., 2003; Yang y col., 2011). Finalmente, se ha descrito la existencia de una superestructura de RNA altamente ordenada, SL5, que está implicada en la síntesis de RNA. Esta estructura se extiende dentro de la ORF 1a y está conservada solamente en algunos géneros de CoV (Chen y Olsthoorn, 2010). En el género α , esta estructura puede ser subdividida en tres horquillas (SL5a, SL5b y SL5c) que están parcialmente conservadas en los CoVs del género β (Raman y Brian, 2005; Brown y col., 2007; Guan y col., 2011; Guan y col., 2012). En los CoVs del género γ , se ha determinado la existencia de una estructura similar a la de la horquilla SL5 que

adopta una estructura a modo de barra (*rod-like structure*) (Chen y Olsthoorn, 2010).

La identificación y caracterización funcional de los elementos de RNA en *cis* localizados en el extremo 3' del genoma se ha realizado fundamentalmente en los CoVs BCoV y MHV, pertenecientes al género β (revisado en Sola y col., 2011b; Madhugiri y col., 2014). Justo detrás del codón de terminación del gen N se encuentran dos estructuras de RNA funcionalmente importantes en la síntesis de RNA, una horquilla de gran complejidad (*Bulged Stem-Loop* o BSL) y un *pseudoknot* (PK) que solapa en 5 nt con el BSL (Hsue y Masters, 1997; Williams y col., 1999; Hsue y col., 2000; Goebel y col., 2004a; Goebel y col., 2004b). Ambas estructuras están muy conservadas en todos los CoVs del género β . Sin embargo, los CoVs del género α sólo conservan el PK y los del género γ el BSL (Williams y col., 1999; Dalton y col., 2001; Madhugiri y col., 2014), sugiriendo que los CoVs de estos géneros deben presentar diferencias específicas en el mecanismo de replicación con respecto a los CoVs del género β . Una característica importante de estos dos elementos es que solapan y por lo tanto no pueden coexistir, lo que ha llevado a proponer que ambos elementos pueden adoptar estructuras alternativas que podrían actuar como *switch* molecular en los procesos de replicación o transcripción en los CoVs del género β (Goebel y col., 2004b).

Adyacente al PK se localiza una región hipervariable (HVR) altamente estructurada que contiene un octanucleótido (GGAAGAGG) universalmente conservado en una región de cadena sencilla. La HVR se encuentra muy poco conservada tanto a nivel de secuencia como de estructura entre los diferentes CoVs (Williams y col., 1993; Dalton y col., 2001; Liu y col., 2001; Madhugiri y col., 2014), y hasta la fecha se desconoce el papel de la HVR y del octanucleótido en la síntesis de RNA. Finalmente, existen varios estudios realizados con minigenomas de los virus MHV y BCoV que indican que la cola de poliA constituye otro elemento en *cis* necesario para la replicación, cuya función parece estar mediada por la interacción con la proteína de unión a poliA (PABP) (Spagnolo y Hogue, 2000).

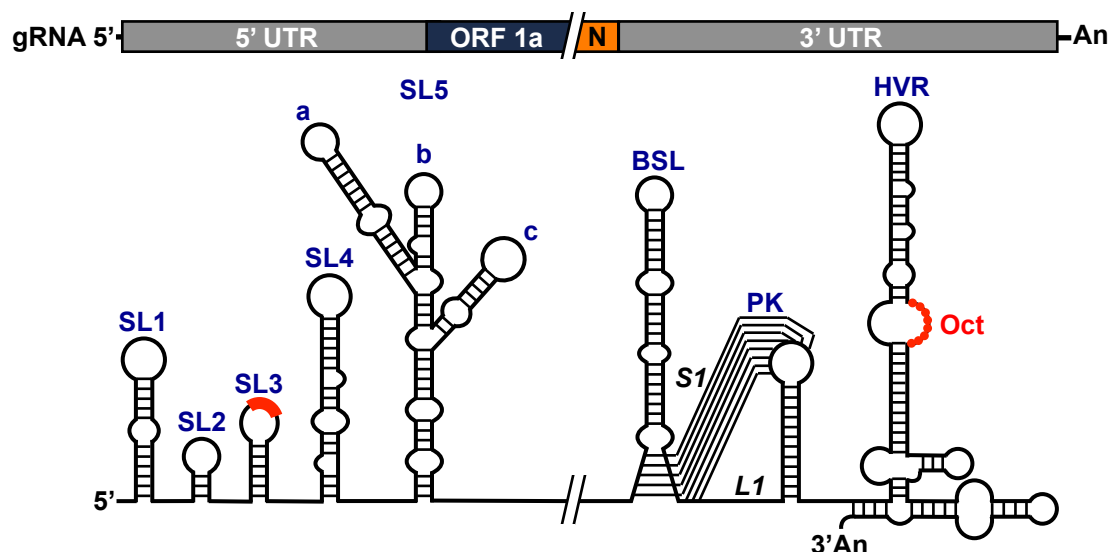


Figura 6. Dominios de RNA en los extremos del genoma de los CoVs. En la parte superior se muestra el esquema de los extremos del genoma viral. SL, horquilla o *stem-loop*. La CS se muestra en una caja roja sobre el SL3. BSL, *bulged stem-loop*; PK, *pseudoknot*; S1, L1, *stem 1* y *loop 1* del *pseudoknot*; HVR, región hipervariable; Oct, octanucleótido conservado 5'-GGAAGAGG-3'; An, poliA.

2.4. Proteínas virales implicadas en síntesis de RNA de CoV

La mayor parte de las proteínas virales implicadas en la replicación y transcripción de CoV están codificadas en el gen de la replicasa (Fig. 7). Este se traduce al inicio de la infección dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab, las cuales se autoprocenan de una forma perfectamente regulada en el tiempo, dando lugar a 16 proteínas no estructurales (nsps) (Ziebuhr, 2005; Gorbalenya y col., 2006). Este procesamiento lo realizan tres cistein-proteasas, la 3CL (nsp5) o proteasa principal, que es responsable de su autoprocensamiento y del procesamiento de todas las nsps situadas a partir de su extremo C-terminal, y dos proteasas similares a papaína (PLP1 y PLP2) que se localizan en la proteína nsp3 y son responsables del procesamiento de la región amino de ambas poliproteínas (Fig. 7). En el caso del virus de la bronquitis infecciosa (IBV) y del SARS-CoV, sólo se ha descrito la presencia de la proteasa PLP2 (Ziebuhr, 2005).

Las nsps 1 y 2 están poco conservadas en CoV y su función en la síntesis de RNA no es del todo conocida. Se ha descrito que la nsp1 se une a elementos *in cis* necesarios para la replicación, sin embargo hasta la fecha no se ha podido demostrar

un papel relevante de esta proteína en la síntesis de RNA (Gustin y col., 2009). En cuanto a la nsp2 se ha determinado que se relocaliza a los sitios de síntesis del RNA viral (Gustin y col., 2009) y que su eliminación o mutación produce una disminución del 50% en la síntesis del RNA viral (Graham y col., 2005; Graham y Denison, 2006).

Las nsps 3, 4 y 6 contienen dominios transmembrana y son las responsables de la formación de las VDMs y de proporcionar el esqueleto molecular para el ensamblaje del CRT en las VDMs (Kanjanaaluethai y col., 2007; Oostra y col., 2007; Imbert y col., 2008; Oostra y col., 2008; Gadlage y col., 2010). Se desconoce si estas proteínas intervienen directamente en la síntesis del RNA viral.

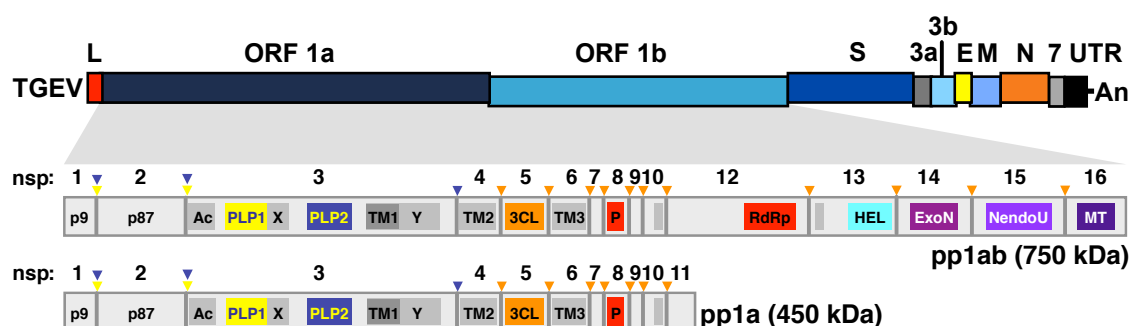


Figura 7. Organización y procesamiento proteolítico de la replicasa del TGEV. Se muestra un esquema del genoma y de la poliproteínas pp1a y pp1ab del TGEV. Los sitios de procesamiento por las proteasas PLP1, PLP2 y 3CL se indican con triángulos invertidos, amarillos, azules y naranjas, respectivamente. Las nsps están numeradas del 1 al 11 en el caso de la poliproteína pp1a y del 1 al 10 y del 12 al 16 en el caso de la poliproteína pp1ab. P9 y p87, proteínas N-terminales de 9 y 87 kDa, respectivamente; Ac, dominio ácido; PLP1 y PLP2, proteasas accesorias similares a papaína 1 y 2; X, dominio con actividad adenosina difosfato ribosa fosfatasa; Y, dominio que contiene una región transmembrana y un dominio potencial de unión a metales; TM1, TM2 y TM3, potenciales dominios transmembrana; 3CL, proteasa principal; P, primasa; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; Hel, helicasa; ExoN, exoribonucleasa 3'-5'; NendoU, endoribonucleasa; MT, 2'-O-ribosa metiltransferasa.

El gen de la replicasa codifica dos actividades esenciales para la síntesis de RNA, una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) que reside en la nsp12 y una helicasa de RNA que reside en la nsp13, de forma similar a otros virus con genomas RNA de polaridad positiva. La nsp12, además de contener los dominios típicos de dedo, palma y pulgar, presentes en otras RdRps virales, contiene un dominio N-terminal único que es esencial para la actividad RdRp y que media la interacción con otras proteínas, como las nsps 5, 8, 9 y 14 (Brockway y col., 2003; Cheng y col., 2005;

Gorbalenya y col., 2006; Imbert y col., 2008; Xu y col., 2010). Recientemente, la proteína nsp12 se ha caracterizado bioquímicamente *in vitro*, demostrándose que posee actividad RdRp dependiente de iniciador (te Velthuis y col., 2010; Ahn y col., 2012). La nsp13 contiene un dominio helicasa del tipo SF1 unido por su región N-terminal a un dominio de unión a zinc que es crítico para la actividad helicasa *in vitro* (Seybert y col., 2005; Gorbalenya y col., 2006). Estudios bioquímicos han demostrado que la helicasa de CoV tiene actividad NTPasa y dNTPasa, es capaz de desenrollar RNA y DNA de doble cadena (dsRNA y dsDNA, respectivamente) en dirección 5'-3' y su actividad *in vitro* se ve incrementada cuando está presente la nsp12, sugiriendo que ambas proteínas (nsp12 y nsp13) interaccionan en el CRT (Seybert y col., 2000; Tanner y col., 2003; Ivanov y col., 2004b; Ivanov y Ziebuhr, 2004; Lee y col., 2010; Adedeji y col., 2012). La nsp13 presenta actividad RNA 5'-trifosfatasa además de la actividad helicasa, lo que la convierte en la proteína viral candidata para llevar a cabo la etapa inicial de la incorporación del cap en el extremo 5' del genoma (Tanner y col., 2003; Ivanov y col., 2004b).

En el extremo C-terminal de la poliproteína pp1a se encuentra un grupo de proteínas de pequeño tamaño, nsp7-nsp10, las cuales se han implicado en la síntesis del RNA viral (Deming y col., 2007). La nsp8 tiene una actividad RdRp no canónica que media la síntesis de pequeños oligonucleótidos independientemente de iniciador, y ha sido propuesta como la RNA primasa encargada de generar los iniciadores necesarios para la síntesis de RNA mediada por la RdRp (Imbert y col., 2006; te Velthuis y col., 2010). Aunque muchos virus RNA dependen de iniciadores para la síntesis de RNA, los CoVs son los únicos virus RNA conocidos que incorporan en su genoma la enzima responsable de su síntesis. Estudios recientes, han mostrado que la nsp8 interacciona con la nsp7 formando un complejo hexadecamérico (8 moléculas de cada proteína) que confiere procesividad a la RdRp y permite que la RdRp catalice la síntesis *de novo* de RNAs de hasta 340 nt de longitud (Zhai y col., 2005; te Velthuis y col., 2010; Subissi y col., 2014). La nsp9 se une a RNA de cadena sencilla sin especificidad de secuencia e interacciona con la nsp12 (Brockway y col., 2003; Egloff y col., 2004; Sutton y col., 2004). Esta proteína forma dímeros y su dimerización es crítica para la replicación viral (Miknis y col., 2009). Atendiendo a sus propiedades estructurales y funcionales, se ha propuesto que la proteína nsp9 es un

componente del núcleo catalítico del CRT, cuya principal función sería estabilizar los RNAs virales durante su síntesis y procesamiento. Finalmente, la nsp10 incluye dos dominios de unión a zinc y se ha implicado en la síntesis de RNA viral de polaridad negativa (Siddell y col., 2001). Estudios recientes, han mostrado que la nsp10 es un activador de la actividad exonucleasa de la nsp14 (Bouvet y col., 2012) y un componente del complejo proteico implicado en la incorporación del cap al extremo 3' del genoma viral (Bouvet y col., 2010).

El gen de la replicasa codifica una serie de enzimas de procesamiento de RNA que no están presentes en otros virus RNA como una exoribonucleasa 3'-5' (nsp14) (Minskaia y col., 2006), una endoribonucleasa (nsp15) (Ivanov y col., 2004a; Kang y col., 2006) y una 2'-O-ribosa metiltransferasa (nsp16) (Decroly y col., 2008; Zust y col., 2011), las cuales son esenciales para la síntesis eficiente de RNA viral (Almazán y col., 2006). La actividad exoribonucleasa de la proteína nsp14 forma parte de un sistema de corrección de errores durante la síntesis de RNA, que permite la replicación fiel de un genoma tan grande como el de los CoVs (Eckerle y col., 2007; Eckerle y col., 2010). La nsp14 presenta también actividad metiltransferasa (Chen y col., 2009), que junto con la actividad 2'-O-ribosa metiltransferasa de la nsp16 podrían actuar de forma coordinada en la incorporación del cap en el extremo 5' del genoma viral (Decroly y col., 2008; Subissi y col., 2014). Las proteínas nsp14 y nsp16 interaccionan con la nsp10, la cual actúa como un activador de la actividad exoribonucleasa de la nsp14 y de la 2'-O-ribosa metiltransferasa de la nsp16 (Subissi y col., 2014).

Además de las proteínas nsps codificadas por la replicasa, se ha descrito que la proteína N colocaliza con el CRT y juega un papel importante en la síntesis de RNA, posiblemente a través de su actividad chaperona de RNA (Thiel y col., 2003; Almazán y col., 2004; Schelle y col., 2005; Zúñiga y col., 2007; Grosseohme y col., 2009; Verheije y col., 2010; Zúñiga y col., 2010).

2.5. Proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV

Los virus, debido a su limitada capacidad genética, dependen de la célula hospedadora para llevar a cabo muchos de los procesos de su ciclo biológico, y a menudo secuestran y redirigen proteínas celulares para llevar a cabo estos procesos.

En CoV, se ha propuesto la participación de varios factores celulares en la síntesis del RNA viral. La búsqueda de estas proteínas celulares se ha iniciado hace pocos años y la mayoría de ellas han sido identificadas en base a su capacidad de interactuar con componentes virales del CRT (Chen y col., 2009; Xu y col., 2010) o con motivos estructurales de RNA relevantes en la síntesis del RNA viral (Shi y Lai, 2005; Galán y col., 2009; Sola y col., 2011b). La mayoría de estos estudios se han realizado en CoVs del género β y fundamentalmente en MHV, BCoV y SARS-CoV. Por lo general, las proteínas identificadas incluyen proteínas de procesamiento de RNA, factores de traducción y chaperonas celulares, entre otras (Sola y col., 2011b).

Una de las proteínas más estudiadas es la ribonucleoproteína heterogénea nuclear (hnRNP) A1 que está implicada en el procesamiento de pre-mRNAs (*splicing*). La hnRNP A1 se une a la cadena complementaria de las TRSs (Li y col., 1997) y a los dominios BSL y HVR de la región 3' UTR (Huang y Lai, 2001). Estudios de sobreexpresión y silenciamiento génico han demostrado un papel importante de esta proteína en la síntesis de RNA de CoV y se ha propuesto que podría estar implicada en la aproximación de secuencias distales en el genoma durante la síntesis de RNA (Li y col., 1997; Shi y col., 2000; Huang y Lai, 2001; Shen y Masters, 2001). Otras hnRNPs implicadas en la síntesis de RNA de CoV son la hnRNP Q y la proteína de unión a trectos de polipirimidinas (PTB) o hnRNP I. La hnRNP Q se une tanto a la región 5' UTR como a su secuencia complementaria en la cadena negativa y su silenciamiento induce un retraso en la síntesis de RNA viral (Choi y col., 2004). Por otra parte, la PTB se une específicamente a las TRSs (Li y col., 1999) y a la cadena complementaria de la secuencia 3' UTR (Huang y Lai, 1999), justo en los sitios complementarios a los que se une la hnRNP A1. Datos previos con el virus MHV mostraron que la mutación en la TRS del líder de los sitios de interacción con la PTB afectaba negativamente a la síntesis del RNA viral, sugiriendo un papel de la PTB en transcripción (Li y col., 1999; Choi y col., 2004). Sin embargo, no se puede descartar que el efecto observado sea debido a que al mutar los sitios de interacción de la PTB se estén afectando también los sitios de unión de la hnRNP A1. En este sentido, estudios recientes con el virus TGEV han mostrado que la PTB es un factor negativo para la síntesis del RNA viral (Sola y col., 2011a), lo que contrasta con los datos previos obtenidos con el virus MHV. Finalmente, se ha identificado una serie de

proteínas que se unen específicamente al 3' UTR del genoma como la PABP, la aconitasa mitocondrial y las proteínas de choque térmico (HSPs) HSP40, HSP60 y HSP70. Aunque existen algunas evidencias experimentales que sugieren su implicación en la síntesis de RNA viral, su papel directo en la misma todavía no ha sido demostrado (Spagnolo y Hogue, 2000; Nanda y Leibowitz, 2001; Nanda y col., 2004).

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio con el virus TGEV, utilizando técnicas de cromatografía de afinidad a RNA y espectrometría de masas, han permitido identificar 10 proteínas celulares que interaccionan con los extremos del genoma donde se localizan las secuencias mínimas necesarias para su replicación. Entre estas proteínas se incluyen la PTB que interacciona preferencialmente con el extremo 5' del genoma, y un conjunto de 9 proteínas que interaccionan con el extremo 3', entre las que se incluyen las hnRNPs A0, A1, A2/B1, Q y U, los factores de traducción glutamil-prolil tRNA sintetasa (EPRS), arginil tRNA sintetasa (RRS) y la PABP, y el factor transcripcional p100 (Galán y col., 2009). El papel funcional de estas proteínas en la síntesis de RNA se analizó mediante experimentos de silenciamiento génico, demostrándose que la PTB es un factor negativo para la síntesis de RNA mientras que las proteínas hnRNP Q, EPRS y PABP juegan un papel positivo en la síntesis de RNA de CoV (Galán y col., 2009; Sola y col., 2011a).

Aunque cada vez son más las evidencias experimentales sobre la implicación de proteínas celulares en la síntesis de RNA de CoV, todavía no se conoce el mecanismo de acción de las mismas.

3. RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A VIRUS

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa antiviral del huésped. Durante la infección, los distintos componentes virales (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) actúan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son reconocidos por receptores celulares específicos (PRRs). Este reconocimiento desencadena varias cascadas de señalización que culminan con la síntesis de IFN y citoquinas proinflamatorias, que en último término promueven la eliminación del virus en las células infectadas, establecen un estado antiviral en células vecinas no

infectas y modulan la respuesta inmune adaptativa (Jensen y Thomsen, 2012; Zinzula y Tramontano, 2013; Chiang y col., 2014; Kindler y Thiel, 2014).

3.1. Respuesta antiviral activada por dsRNA

En virus RNA, el dsRNA es el principal PAMP y desencadena la activación de un mecanismo antiviral, ampliamente caracterizado, que conduce a la inhibición de la traducción, la inducción transcripcional de genes antivirales, y a la muerte celular (Fig. 8) (Jensen y Thomsen, 2012; Zinzula y Tramontano, 2013). En CoVs, el dsRNA está presente a lo largo del genoma en regiones que forman estructuras secundarias complejas o puede ser generado como un intermediario de la replicación o transcripción del genoma (Sawicki y Sawicki, 2001; Brian y Baric, 2005; Knoops y col., 2008; Sola y col., 2011b). La activación de la respuesta antiviral por dsRNA, está mediada principalmente por dos familias de PRRs, los receptores de tipo Toll (TLRs) y los receptores de tipo gen I inducible por ácido retinoico (RLRs), y en menor medida por la 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5'OAS) y la quinasa dependiente de dsRNA (PKR) (Jensen y Thomsen, 2012; Zinzula y Tramontano, 2013).

Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana que se expresan mayoritariamente en células presentadoras de antígeno, aunque también se ha descrito su expresión basal e inducible en otros tipos celulares. Entre ellos, el principal sensor de dsRNA es el receptor TLR3 que se localiza fundamentalmente en las membranas de endosomas y lisosomas. Tras la unión con el dsRNA, el TLR3 dimeriza e induce una cascada de señales intracelulares que activa el factor 3 regulador del Interferón (IRF3), el factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y la proteína activadora 1 (AP-1). Posteriormente estos factores de transcripción activados se translocan al núcleo donde promueven la activación de la expresión de IFN tipo I y citoquinas proinflamatorias (Fig. 8) (Mogensen, 2009; Jensen y Thomsen, 2012; Totura y Baric, 2012).

A diferencia de los TLR, los RLRs son un grupo de helicasa de RNA que actúan como sensores citoplasmáticos y se expresan en la mayoría de tipos celulares, incluidos los fibroblastos (Jensen y Thomsen, 2012). Entre estos, los principales sensores de dsRNA son el gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) y el gen-5

asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5). RIG-I reconoce ssRNA 5'-trifosforilados y dsRNA cortos, mientras que MDA5 reconoce dsRNAs de mayor longitud y dsRNAs con defectos en la estructura cap. Una vez reconocidas las moléculas de dsRNA, RIG-I y MDA5 sufren un cambio conformacional, exponen sus dominios reclutadores de caspasas, e inician una cascada de señalización mediada por la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS), la cual termina con la activación de IRF3, IRF7 y NF- κ B, su translocación al núcleo y la posterior activación de la expresión de IFN tipo I y citoquinas proinflamatorias (Fig. 8). En el caso de CoV, el principal sensor de dsRNA en células no inmunes es MDA5, aunque en algunos tipos celulares como los oligodendrocitos también se ha implicado a RIG-I (Li y col., 2010; Husser y col., 2011; Züst y col., 2011; Menachery y col., 2014).

La PKR es una serín-treonín quinasa que se expresa constitutivamente y se localiza fundamentalmente en el citoplasma celular (Garcia y col., 2007; Mogensen, 2009; Nakayama y col., 2010). La unión con el dsRNA induce un cambio conformacional de la PKR que conlleva a la exposición del dominio quinasa y a su autofosforilación. Posteriormente, la PKR activada es capaz de fosforilar el factor de traducción eIF2 α , promoviendo la inhibición la síntesis de proteínas (Garcia y col., 2007; Nakayama y col., 2010). Por otra parte, la PKR también promueve la activación de NF- κ B y p38 MAPK induciendo la expresión de IFN tipo I y citoquinas proinflamatorias (Fig. 8) (Mogensen, 2009).

Finalmente, otro sensor celular de dsRNA es la proteína 2'-5'OAS, una de las primeras proteínas descritas que interviene en la respuesta antiviral (Hovanessian y col., 1977). Tras la unión con el dsRNA, la proteína 2'-5'OAS sufre un cambio conformacional que promueve su activación, generando 2'-5' oligoadenilatos a partir de ATP. Posteriormente, las moléculas de 2'-5' oligoadenilatos interaccionan con la RNasa L promoviendo su activación y la consiguiente degradación de RNAs virales y celulares, lo que se traduce en una inhibición generalizada de la traducción (Fig. 8). Por otra parte, el corte de los RNAs por la RNasa L genera pequeños RNAs, con frecuencia en forma de dúplex, los cuales activan la respuesta antiviral mediada por RIG-I y MDA5 (Hassel y col., 1993; Barral y col., 2009; Jensen y Thomsen, 2012).

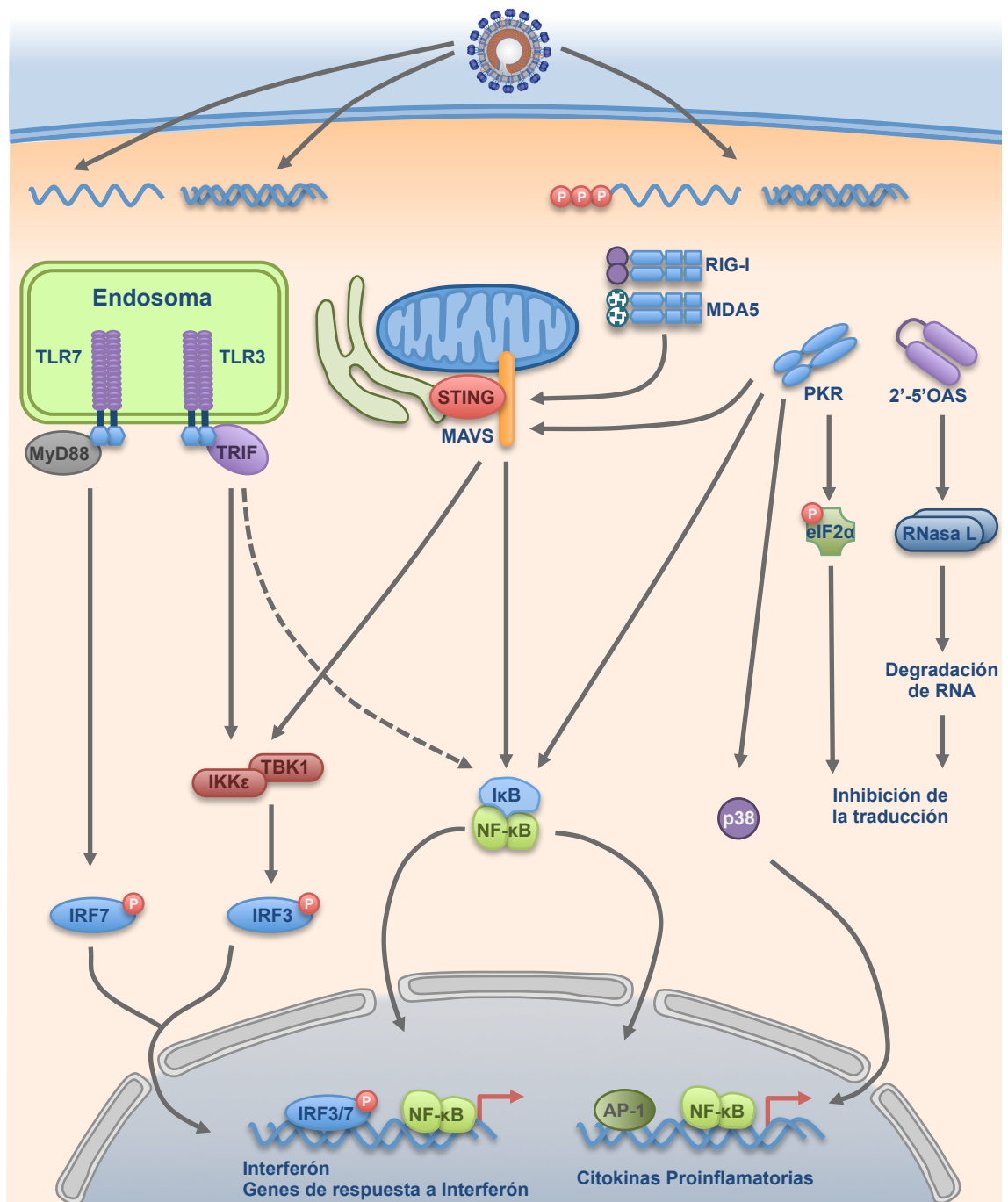


Figura 8. Respuesta antiviral activada por dsRNA. Se muestra el esquema del reconocimiento del dsRNA por los sensores celulares, las vías de señalización que se activan y la repuesta celular final frente al dsRNA.

3.2. Mecanismos para contrarrestar la respuesta antiviral activada por dsRNA

Durante la evolución, los virus han desarrollado multitud de estrategias para contrarrestar la respuesta inmune innata activada por dsRNA. Estas estrategias son muy diversas y en general están dirigidas a ocultar o enmascarar los dsRNA para evitar su reconocimiento por los sensores celulares o bloquear distintos componentes de las vías de señalización de la respuesta inmune innata (Zinzula y Tramontano, 2013).

De forma similar a otros virus RNA de polaridad positiva, la replicación en CoV ocurre en el citoplasma de la célula, generándose intermediarios replicativos de dsRNA, los cuales activarían la respuesta antiviral del huésped. Además de los dsRNAs generados durante la replicación y transcripción, el genoma y los sgRNAs de los CoVs pueden contener dominios de RNA altamente estructurados que podrían ser reconocidos por los sensores celulares, de manera similar a lo descrito en otros sistemas virales (Kato y col., 2008; Saito y col., 2008; Pichlmair y col., 2009; Uzri y Gehrke, 2009; Feng y col., 2014).

Para contrarrestar esta respuesta, los CoVs han desarrollado varias estrategias (Fig. 9). En este sentido, se ha propuesto que las VDMs, donde tiene lugar la síntesis de RNA viral, prevendrían la activación de la respuesta inmune innata ocultando los intermediarios replicativos de dsRNA de manera que fueran inaccesibles a los sensores de detección citoplasmáticos (Gosert y col., 2002; Snijder y col., 2006; Zinzula y Tramontano, 2013). Otros mecanismos se basan en la capacidad de ciertas proteínas virales de interaccionar con el dsRNA impidiendo su reconocimiento por los sensores celulares, como se ha propuesto para la proteína N de todos los CoVs y la proteína 4a del MERS-CoV (Lu y col., 2011; Züst y col., 2011; Totura y Baric, 2012; Zhong y col., 2012; Niemeyer y col., 2013; Kindler y Thiel, 2014; Siu y col., 2014). Sin embargo, estos sistemas no son infalibles y durante la infección aparecen dsRNAs que quedan expuestos a los sensores celulares y activan la respuesta inmune innata. En este sentido, los CoVs codifican diversas proteínas que interfieren con las diferentes vías de señalización de la respuesta innata a distintos niveles, previniendo de esta manera el establecimiento de un estado antiviral efectivo (Fig. 9) (Totura y Baric, 2012; Zhong y col., 2012). Entre estas proteínas cabe destacar las proteínas N y

ns2 del virus MHV que inhiben la activación de la RNasa L (Ye y col., 2007; Zhao y col., 2012), las proteínas M y nsp3 del SARS-CoV que secuestran el complejo TBK1/IKK/IRF3 e impiden la activación del IRF3 (Devaraj y col., 2007), la nsp3 del

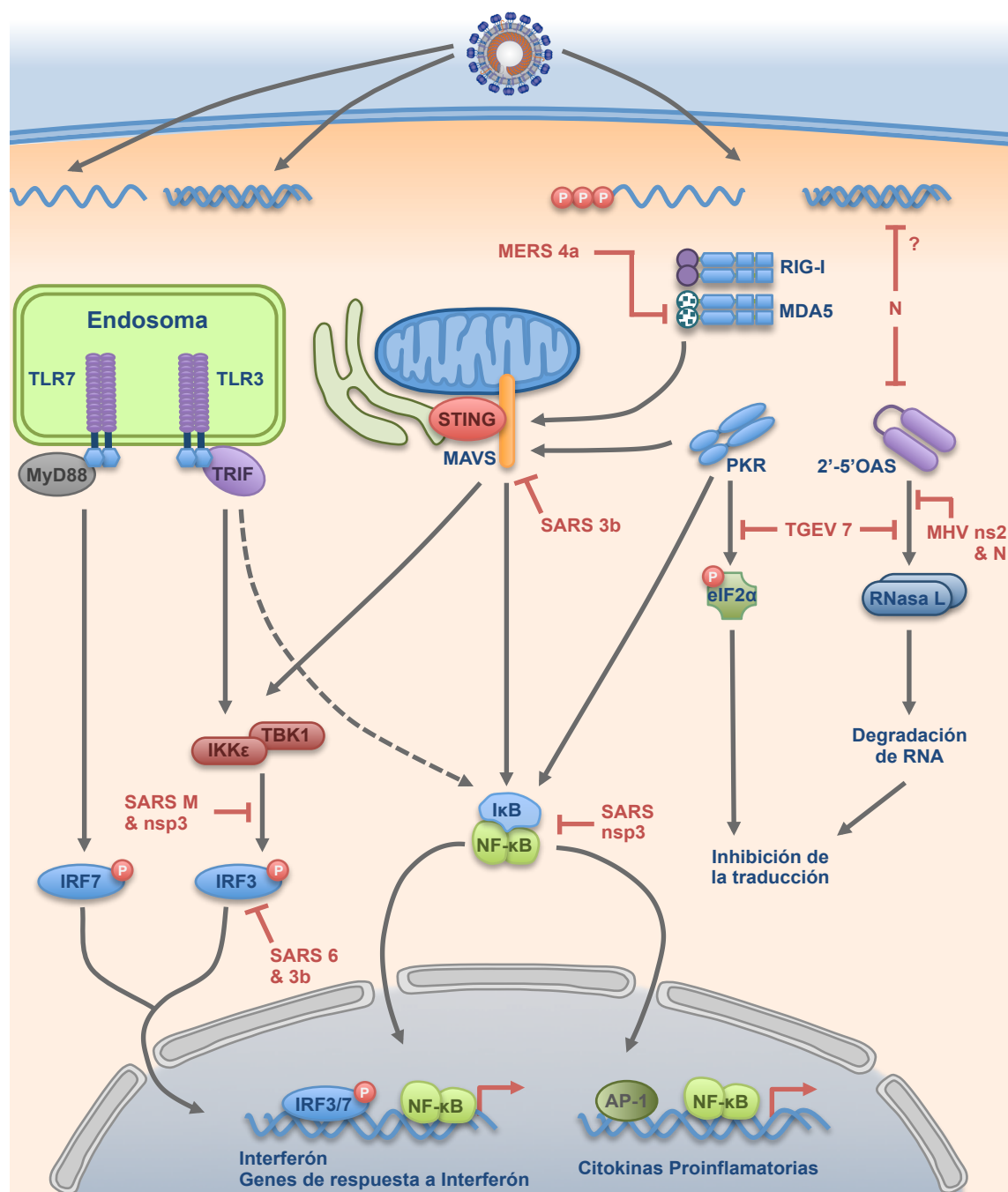


Figura 9. Antagonistas de CoVs frente a la respuesta antiviral activada por dsRNA. Se indica las vías de señalización de la respuesta innata que se activan por el dsRNA y las etapas afectadas por las proteínas de CoVs (en rojo).

SARS-CoV que inhibe la translocación de NF- κ B al núcleo (Frieman y col., 2009), la proteína 3b del SARS-CoV que interacciona con las MAVSs mitocondriales para bloquear la señalización mediada por los RLRs (Freundt y col., 2009), las proteínas N, 6 y 3b del SARS-CoV que bloquean la activación del IRF3 (Kopecky-Bromberg y col., 2007), y la proteína 7 del TGEV que bloquea las vías de la PKR y de la 2'-5'OAS (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013).

Finalmente, se ha descrito recientemente en adenovirus un nuevo mecanismo para contrarrestar la respuesta inmune innata, en donde una estructura de RNA a modo de horquilla interacciona con la PKR impidiendo su activación y en consecuencia la respuesta inmune innata (Carnero y col., 2011; Launer-Felty y Cole, 2014).

4. INFLAMACIÓN

La respuesta antiviral forma parte de la respuesta inflamatoria que el organismo desencadena para combatir diversos microorganismos como los virus. El proceso inflamatorio conlleva la producción y secreción de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores de la inflamación. En etapas tempranas de una infección, las células infectadas de un tejido secretan citoquinas proinflamatorias específicas (Strieter y col., 2002; Kohlmeier y Woodland, 2009) que promueven el reclutamiento hacia los sitios de infección y la diferenciación de leucocitos, como monocitos, granulocitos y células dendríticas, con la consiguiente destrucción de las células infectadas. Sin embargo, una sobreexpresión y acumulación excesiva de estas citoquinas proinflamatorias puede también causar grandes daños en el tejido, por lo que la expresión de estas proteínas debe estar finamente regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Mazumder y col., 2010; Stumpo y col., 2010; Mino y Takeuchi, 2013).

Unos de los mecanismos de regulación de la inflamación a nivel post-transcripcional es el sistema del inhibidor de traducción inducido por IFN- γ (GAIT) (Mukhopadhyay y col., 2009) (Fig. 10). Este sistema, descrito inicialmente en células monocíticas humanas, está inducido por IFN- γ y se basa en el silenciamiento traduccional de diversos mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias.

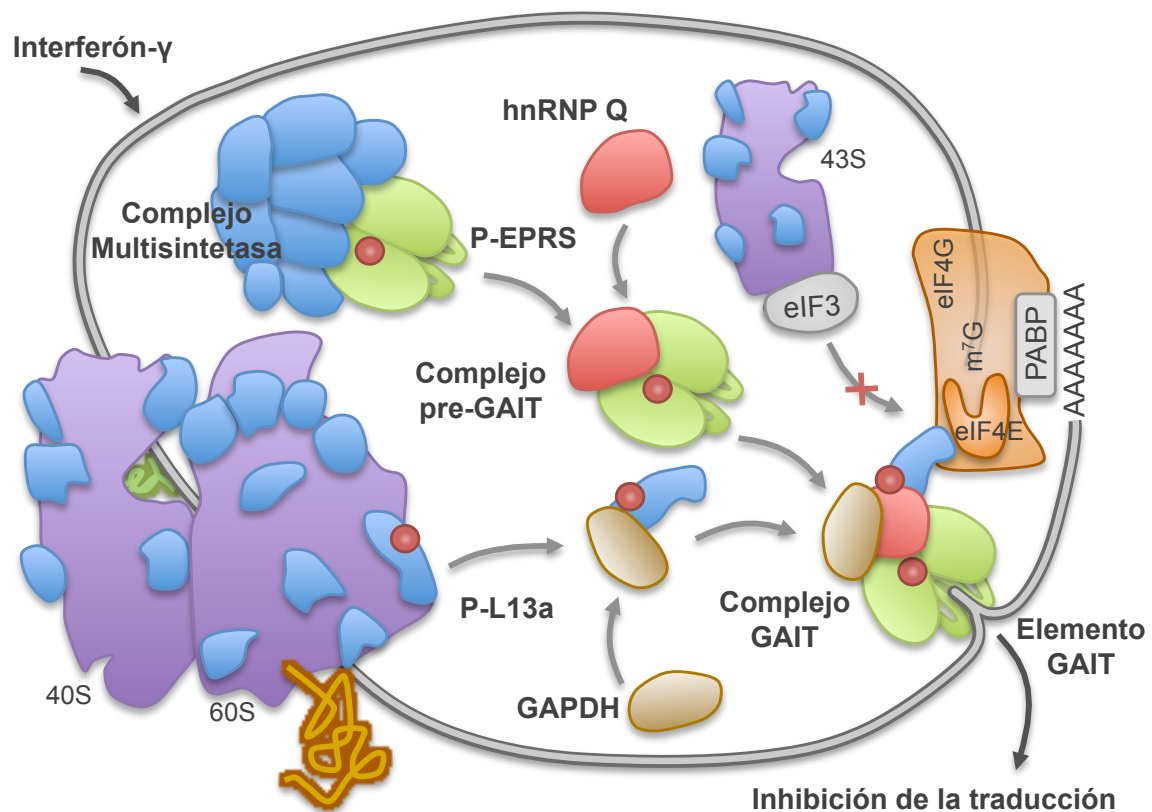


Figura 10. Sistema GAIT. Se muestra una representación esquemática de los componentes del sistema GAIT y su mecanismo de acción. Figura adaptada de (Mukhopadhyay y col., 2009).

Una vez que se inicia la respuesta inflamatoria se sintetiza IFN- γ que actúa de manera paracrina sobre las células vecinas. Tras la unión del IFN- γ a su receptor, se inicia una cascada de señalización que promueve la fosforilación de la EPRS, su liberación del complejo multisintetasa y la posterior interacción con la hnRNP Q para formar un complejo pre-GAIT inactivo. A las 16 h de iniciarse la señalización por el IFN- γ , la proteína ribosomal L13a es fosforilada y liberada de la subunidad 60 S del ribosoma. Posteriormente, la L13a fosforilada se une a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y ambas se asocian al complejo pre-GAIT para formar el complejo GAIT activo. Este complejo proteico se une a través de la EPRS al elemento de RNA GAIT (una estructura a modo de horquilla con un *loop* interno asimétrico), presente exclusivamente en la región 3' UTR de diversos mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias. Esta interacción, junto con la circularización del mRNA diana, permite el acercamiento espacial del complejo GAIT al complejo de iniciación

de la traducción y la interacción de la L13a del complejo GAIT con el factor de iniciación eucariótico 4G (eIF4G). Esta interacción impide el reclutamiento de nuevos ribosomas por el factor eIF3 y consecuentemente se silencia la traducción del mRNA (Mukhopadhyay y col., 2009). El sistema GAIT supone una regulación temporal, ordenada y específica de la traducción de los mRNAs que poseen el elemento GAIT en su extremo 3' UTR, sin afectar la traducción global de la célula (Mukhopadhyay y col., 2009; Mazumder y col., 2010; Gebauer y col., 2012).

Los CoVs son agentes causales de importantes enfermedades respiratorias y entéricas, cuyo mecanismo de replicación es prácticamente desconocido. El objetivo principal de esta tesis consiste en la caracterización funcional de proteínas celulares implicadas en la síntesis del RNA viral que interaccionan con el extremo 3' del genoma, utilizando como modelo experimental el virus del TGEV. Estos estudios permitirán caracterizar el mecanismo de acción de estas proteínas y aplicar los conocimientos obtenidos al desarrollo de antivirales y vacunas frente a CoV. Los objetivos específicos de esta tesis son los siguientes:

- 1.** Análisis funcional de la relevancia de las proteínas celulares que interaccionan con el extremo 3' del genoma del TGEV en la síntesis del RNA viral mediante silenciamiento génico.
- 2.** Identificación y caracterización de los motivos de RNA del extremo 3' del genoma viral que interaccionan con las proteínas celulares implicadas en la síntesis del RNA viral.
- 3.** Estudio de la relevancia funcional de los motivos de RNA virales identificados en el ciclo infectivo del TGEV.

1. CÉLULAS EUCARIOTAS

1.1. Líneas celulares

La línea celular ST (swine testis), derivada de testículo embrionario de cerdo, fue inicialmente desarrollada por McClurkin y Norman (1966) y cedida al laboratorio por el doctor L. Kemeney (National Animal Disease Center, Ames, Iowa, EEUU). La línea celular BHK-pAPN (Delmas y col., 1992), derivada de la línea epitelial de riñón de hámster BHK-21 (ATCC CCL10) transformada establemente con la aminopetidasa porcina (receptor del TGEV), fue cedida por el doctor Huber Laude (Unité de Virologie Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, Francia). La línea celular Huh-7, derivada de hepatocarcinoma humano, fue cedida por el doctor R. Bartenschlager (University of Heidelberg, Heidelberg, Alemania). La línea celular monocítica humana U937 fue cedida por el Dr. M. Fresno (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CBMSO, CSIC-UAM, España).

1.2. Cultivo de células eucariotas

Las líneas celulares ST, BHK-pAPN y Huh-7 se crecieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con una humedad del 98% en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 100 UI/mL de penicilina (Sigma), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma) y suero fetal de ternera (SFT) al 10%. En caso de las células BHK-pAPN, cada cuatro pases se cultivaron en presencia del agente de selección genética (G418), el cual se añadió al medio de cultivo en una concentración de 1.5 mg/mL.

La línea celular U937 se creció a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% con una humedad del 98% en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (Sigma) suplementado con 100 UI/mL de penicilina (Sigma), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma) y SFT al 10%.

Todas las líneas celulares se almacenaron mediante congelación en nitrógeno líquido a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/mL en dimetil sulfoxido (Sigma) al 10% en SFT.

2. VIRUS

2.1. Aislados virales

El aislado PUR46-MAD del TGEV (código de acceso del GenBank, AJ271965) (Sánchez y col., 1990; Almazán y col., 2000; Penzes y col., 2001) corresponde al clon PUR46-CC120-MAD aislado en el laboratorio a partir del aislado Purdue (Doyle y Hutchings, 1946), el cual fue cedido por el Dr. E. H. Bohl (Ohio State University, Ohio, EEUU).

El aislado PUR46-C11 del TGEV (Sánchez y col., 1999), que presenta la misma secuencia que el aislado PUR46-MAD con la excepción del gen S, se aisló en nuestro laboratorio a partir del aislado PUR46-SW11, el cual fue cedido por el Dr. M. Pensaert (Gante, Bélgica).

Los virus recombinantes rescatados a partir de la transfección del clon infectivo del TGEV (rTGEV) presentan el fondo genético del aislado PUR46-MAD del TGEV con la excepción del gen S que deriva del aislado del TGEV *purdue type virus* (PTV) (Sánchez y col., 1999; Almazán y col., 2000).

2.2. Crecimiento y titulación del TGEV

Los dos aislados del TGEV, PUR46-MAD (Sánchez y col., 1990) y PUR46-C11 (Sánchez y col., 1999), se crecieron y titularon en células ST según lo descrito previamente (Correa y col., 1988). Para la generación de los lotes o stocks de virus, las células ST, crecidas hasta el 100% de confluencia, se infectaron a una multiplicidad de infección (mdi) de 0.1-1 unidades formadoras de placa (UFP) por célula. El sobrenadante de esta infección se recogió a las 24 h después de la infección (hdi) y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

El aislado PUR46-MAD se utilizó para infectar células BHK-pAPN y ST, mientras que el aislado PUR46-C11 se utilizó para infectar células Huh-7.

2.3. Purificación de viriones del TGEV

Las células ST se infectaron con el aislado PUR46-MAD a una mdi de 5 UFP/célula. A las 24 hdi, los sobrenadantes se recogieron y se clarificaron por

centrifugación a 6000 $\times g$ durante 20 min a 4°C. El virus clarificado se sedimentó por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 31% en tampón TEN (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) a 112000 $\times g$ durante 2 h a 4°C, se resuspendió en tampón TEN con Tween-20 al 0.05% y se centrifugó a través de un gradiente continuo de sacarosa del 30 al 42% en tampón TEN a 112000 $\times g$ durante 2 h a 4°C. El gradiente se fraccionó desde el fondo y las fracciones que contenían virus se identificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y tinción con el reactivo *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma), siguiendo las instrucciones del proveedor. Las fracciones con virus se juntaron, se diluyeron en tampón TEN y se centrifugaron a 107000 $\times g$ durante 1 h a 4°C. Los viriones se resuspendieron en tampón TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) y la concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce), siguiendo las indicaciones del fabricante. El virus purificado se usó inmediatamente o se congeló a -70°C hasta su uso.

2.4. Tratamiento con proteasa K de viriones purificados del TGEV

30 μg de viriones purificados se trataron con 300 ng de proteasa K (Roche) en un volumen final de 450 μL , durante 30 min a 25°C con agitación suave. Una vez finalizada la reacción, la proteasa K se inactivó mediante incubación con 5 mM del inhibidor de proteasa K *Pefabloc SC* (Sigma) durante 5 min a 4°C. Los viriones tratados con proteasa K se sedimentaron por ultracentrifugación a través de 2 mL de un colchón de sacarosa al 31% en tampón TEN a 112000 $\times g$ durante 1 h a 4°C, se resuspendieron en tampón de Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.1 M DTT, 10% glicerol) y se congelaron a -70°C hasta su análisis.

3. BACTERIAS

3.1. Cepas y cultivos de bacterias

La cepa DH10B de *E. coli* (GibcoBRL) [F^- *mcr A* Δ (*mrr-hsdRMS-mcr-BC*) ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara,leu*)7697 *galU* *galK* λ^- *rpsL* *nupG*] se utilizó de rutina para el clonaje de DNA y la amplificación de plásmidos.

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) o en placas de LB-agar a 30 o 37°C, según se indique (Sambrook y Russell, 2001). El medio se suplementó con los antibióticos adecuados cuando fue necesario (150 µg/mL de ampicilina, 13.6 µg/mL de cloranfenicol o 50 µg/mL de kanamicina).

3.2. Preparación de bacterias competentes

Para la preparación de bacterias DH10B competentes para electroporación, se partió de una colonia crecida en medio sólido, la cual se inoculó en dos litros de medio SOB (20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 0.5 g/L NaCl, 0.18 g/L KCl) y se creció a 37°C hasta alcanzar una DO_{550} de 0.7. A continuación, el cultivo se enfrió a 4°C durante 10 min, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000 xg durante 15 min a 4°C y se lavaron cuatro veces con una solución previamente enfriada a 4°C de glicerol al 10%, utilizando un volumen del cultivo inicial para el primer lavado y reduciendo el volumen a la mitad en los lavados sucesivos (2 L, 1 L, 0.5 L y 0.25 L, respectivamente). Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 7 mL de glicerol al 10%, se alicuotearon y se congelaron a -70°C.

3.3. Transformación de bacterias mediante electroporación

Las bacterias DH10B competentes se transformaron mediante electroporación con el DNA de interés (20-40 ng) diluido en 50 µL de agua. El DNA diluido se mezcló con 50 µL de bacterias competentes, se incubó durante 1 min a 4°C, se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad) y se aplicó un pulso eléctrico de 25 µF, 2.5 kV y 200 Ω, utilizando un electroporador *GenePulser* (BioRad). Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 1 mL de medio LB, se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min y se sembraron por extensión en superficie sobre placas de LB-agar con el antibiótico apropiado.

4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

4.1. Plásmidos de clonaje

El plásmido pSL1190 (Pharma Biotech), de alto número de copia, se utilizó para el clonaje y modificación de DNAs de hasta 9 Kb. El plásmido pTNT fue adquirido a

Promega y se utilizó para la generación *in vitro* de los diferentes transcritos de la luciferasa utilizados en esta tesis doctoral.

4.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA para estudios analíticos y su purificación se realizó en geles de *agarosa D-1 Medio EEO* (Conda) al 0.7-1.2 % en TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) con *SYBR Safe DNA gel stain* (Life Technologies). Para la resolución y purificación de fragmentos de DNA de pequeño tamaño (<200 pb) se usó agarosa de bajo punto de fusión *NuSieve GTG Agarose* (Cambrex) a una concentración de 2.5 % en TAE.

4.3. Preparación y purificación de DNA

Para la purificación de plásmidos a partir de cultivos bacterianos a pequeña o mediana escala, se utilizaron los reactivos *Plasmid Mini* o *Midi Kits* (QIAGEN), respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante con las modificaciones adecuadas en función del tamaño y número de copia del plásmido. En el caso de plásmidos recombinantes basados en el plásmido de bajo número de copia pBeloBAC11 (pBAC) (Wang y col., 1997), estos se purificaron a partir de 500 mL de cultivo, crecido a 30°C durante 22 h en medio LB suplementado con 13.6 µg/mL de cloranfenicol, utilizando el reactivo *Large-Construct Kit* (QIAGEN).

La purificación de DNA a partir de reacciones enzimáticas, de fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa y de los productos de DNA amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó utilizando el reactivo *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) o el reactivo *QIAEX II* (QIAGEN) en el caso de fragmentos mayores de 10 kb, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante en cada caso.

4.4. Enzimas de restricción y modificación de DNA

Las enzimas de restricción y modificación de DNA (DNA ligasa T4, fosfatasa alcalina de gamba y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I) se adquirieron de Roche o New England Biolabs. Los tratamientos de restricción, desfosforilación y

ligación de DNA se hicieron siguiendo protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001) y las indicaciones de los proveedores.

4.5. Amplificación de DNA mediante PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *2720 Thermal cycle* (Life Technologies) utilizando la enzima *Amplitaq DNA polymerase* (Life Technologies) para fines analíticos o la enzima *Platinum Pfx DNA polymerase* (Life Technologies) para fines preparativos, siguiendo las indicaciones del proveedor en cada caso. En general, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L utilizando 0.5 U de *Amplitaq DNA polymerase* o 2.5 U de *Platinum Pfx DNA polymerase*, 20 pmoles de los oligonucleótidos correspondientes, una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (Life Technologies) a una concentración final de 0.25 mM, y 25 ng de DNA molde. En todos los casos la temperatura de hibridación se ajustó a 10°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos utilizados, el tiempo de elongación fue aproximadamente de 1 min/kb del DNA a amplificar y se realizaron entre 25 y 35 ciclos de amplificación. Finalmente, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa y su posterior secuenciación en los casos en los que se indique.

5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA

5.1. Extracción y purificación de RNA

Tanto el RNA procedente de transcripciones *in vitro* como el RNA total intracelular de células no infectadas o infectadas fue extraído y purificado utilizando el reactivo *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante en cada caso. El RNA purificado se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, EEUU) y se guardó a -70°C hasta su utilización.

5.2. Análisis de RNA mediante RT-PCR

La síntesis de cDNAs o retrotranscripción (RT) se realizó utilizando el reactivo *High Capacity cDNA RT Kit* (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del

fabricante. En general, las reacciones de RT se realizaron en un volumen de 20 µL, utilizando como molde 100 ng de RNA total intracelular y como iniciadores o *primers* hexanucleótidos al azar proporcionados en el *kit* u oligonucleótidos específicos (10 pmoles) complementarios a la secuencia a amplificar. Una fracción del cDNA generado (1/5 o 1/10 del volumen de reacción) se utilizó como molde para su posterior amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos y las enzimas *Amplitaq DNA polymerase* (Life Technologies) o *Platinum Pfx DNA polymerase* (Life Technologies), como se describe en el apartado 4.5 de esta sección.

5.3. Cuantificación de RNA mediante RT-PCR cuantitativa

En todos los casos, la reacción de RT se realizó con el reactivo *High Capacity cDNA RT Kit* (Life Technologies) utilizando hexanucleótidos al azar como iniciadores, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2 de esta sección. Los cDNAs resultantes se analizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando oligonucleótidos específicos, diseñados con el programa *Primer Express v2.0* (Life Technologies), y el reactivo *SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies) o con ensayos TaqMan (Life Technologies) específicos y el reactivo *Taqman Universal PCR Master Mix* (Life Technologies), siguiendo las especificaciones del proveedor. Para la cuantificación de los RNAs virales (genómico y sgRNAs) se utilizaron tanto oligonucleótidos como ensayos TaqMan específicos (Tabla II), mientras que para la cuantificación de mRNAs celulares se utilizaron exclusivamente ensayos TaqMan (Tabla III). En todos los casos, la qPCR se realizó en un equipo *7500 Real Time PCR System* (Life Technologies) utilizando los parámetros universales de termociclación (95°C-10 min, 40 ciclos de 95°C-15 seg, 60°C-1 min) y los datos se analizaron utilizando el programa *7500 software v2.0.6* (Life Technologies). Los valores correspondientes a las medias de los ciclos de corte (Ct) se usaron para calcular los valores de expresión relativos utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En el caso de usar oligonucleótidos específicos y el reactivo *SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies), al final de la reacción de PCR se añadió un paso de rampa de desnaturalización desde 60°C (Tm de los oligonucleótidos) hasta 95°C, con el fin de analizar la curva de disociación del producto amplificado. Para aumentar la fiabilidad de los resultados, en todos los casos se analizaron tres experimentos independientes

por triplicado. El valor de la cantidad del gRNA viral se utilizó como control endógeno para normalizar la cuantificación de los distintos sgmRNAs y el gen de la beta-glucuronidasa (GUSB) se utilizó como control endógeno para normalizar la cuantificación de los mRNAs celulares, ya que su expresión permanece invariable durante la infección con el TGEV.

5.4. Análisis de la integridad del RNA

La integridad del RNA fue evaluada en un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) y los datos fueron analizados y procesados con el programa informático *2100 Expert* (Agilent Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de RNAs virales mediante RT-qPCR

Oligo. ^(a)	Secuencia (5'→3') ^(b)	Posición ^(c)	Método	Amplicón ^(d)
REP-VS	TTCTTTTGACAAAACATACGGTGAA	4829-4853	SYBR	gRNA
REP-RS	CTAGGCAACTGGTTTGTAACATCTTT	4884-4909		
LCS-VS	CCAACTCGAACTAACTTTGGTAACC	-	SYBR	sgmRNA S
S-RS	TCAATGGCATTACGACCAAAAC	20383-20404		
3a-VS	CGGACACCAACTCGAACTAACTTAC	-	SYBR	sgmRNA 3a
3a-RS	ATCAAGTTCGTCAAGTACAGCATCTAC	24863-24889		
Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTACTTTAACTAG	25-56	SYBR	sgmRNA E
E-RS	CAATGCCCTAGGAAACGTCATAG	25861-25883		
Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTACTTTAACTAG	25-56	SYBR	sgmRNA M
M-RS	GCATGCAATCACACACGCTAA	26140-26160		
Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTACTTTAACTAG	25-56	SYBR	sgmRNA N
N82-RS	TCTCCGACCACGGGAATT	26986-27004		
Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTACTTTAACTAG	25-56	SYBR	sgmRNA 7
7(38)-RS	AAAAGTGAATAAATACAGCATGGAGGAA	28086-28114		
REP-VS	TTCTTTTGACAAAACATACGGTGAA	4829-4853	TaqMan	gRNA
REP-RS	CTAGGCAACTGGTTTGTAACATCTTT	4884-4909		
REP-MGB	FAM-AGGGCACC GTTGTC A-MGB	4861-4875		
Ldrt-VS	CGTGGCTATATCTCTTCTTTACTTTAACTAG	25-56	TaqMan	sgmRNA 7
7(38)-RS	AAAAGTGAATAAATACAGCATGGAGGAA	28086-28114		
7-MGB	FAM-CGAACTAAACGAGATGCT-MGB	28064-28081		

(a) VS, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) FAM, 6-carboxifluoresceína; MGB, grupo de unión a hendidura o surco menor.

(c) Posición en el genoma del TGEV. En los oligonucleótidos de sentido antiviral se indica la posición de la secuencia complementaria. Los oligonucleótidos LCS-VS y 3a-VS comprenden regiones discontinuas que abarcan parte de la TRS de la secuencia líder y de la TRS del gen correspondiente.

(d) Indica el RNA viral amplificado.

Tabla III. Ensayos TaqMan utilizados para el análisis de genes celulares por RT-qPCR

Gen	Especie	TaqMan ID ^(a)
EPRS	Humana	Hs00270083_m1
RRS	Humana	Hs00259879_m1
hnRNP Q	Humana	Hs00749309_s1
hnRNPA2/B1	Humana	Hs00242600_m1
PABP	Humana	Hs00743792_s1
P100	Humana	Hs00205182_m1
TNF-α	Humana	Ss03391318_g1
CCL2	Porcina	Ss03394377_m1
CXCL9	Porcina	Ss03390033_m1
CXCL11	Porcina	Ss03648935_g1
IFN-β	Porcina	Ss03378485_u1
MDA5	Porcina	Ss03386373_u1
RIG-I	Porcina	Ss03381552_u1
GUS-B	Porcina	Ss03387751_u1
TGF-B	Porcina	Ss03382325_u1

(a) ID proporcionado por el fabricante (*Life Technologies*).

5.5. Ensayo de inmunoprecipitación de RNA asociado a proteínas

Para estudiar la interacción de proteínas celulares con el RNA viral en el contexto de la infección se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de RNA asociado a proteínas. Para ello, se crecieron células ST en placas de 15-cm de diámetro hasta confluencia y se infectaron con el aislado PUR46-MAD del TGEV a una mdi de 5. A las 8 hdi las células se levantaron de la placa, se centrifugaron a 2000 xg durante 5 min a 4°C, se resuspendieron en 100 μ L de *RIP Lysis Buffer* (MagnaRIP, Millipore), suplementado con inhibidor de proteasas (Roche) y 1 U/ μ L *RNasin Ribonuclease Inhibitor* (Promega), y se lisaron a 4°C durante 5 min. Finalmente, el lisado celular se centrifugó a 3000 xg durante 2 min a 4°C y el sobrenadante resultante se utilizó para llevar a cabo el ensayo inmunoprecipitación de RNA asociado a proteínas mediante el reactivo *EZ-Magna RIP kit* (Millipore), siguiendo la instrucciones del fabricante. Brevemente, extractos citoplasmáticos procedentes de 1×10^7 células se incubaron con los anticuerpos frente a EPRS, RRS y GFP (inmovilizados sobre bolas magnéticas) en presencia de *RIP immuniprecipitation buffer* durante 12 h a 4°C. Los complejos

RNA-proteína inmunoprecipitados se incubaron con proteinasa K (Promega) durante 30 min a 55°C y el RNA liberado se aisló utilizando el *RNeasy Mini kit* (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. Finalmente, la presencia del gRNA y de los sgRNAs virales en las muestras inmunoprecipitadas se analizó mediante RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla II) y el reactivo *SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies), como se describe en el apartado 5.3 de esta sección.

5.6. Ensayo de retardo de movilidad electroforética en gel (EMSA)

Para el análisis de las interacciones RNA-proteína mediante EMSA, 100 pmol de los oligonucleótidos de RNA biotinados en 3' y 1 pmol de las correspondientes proteínas purificadas se incubaron a 25°C durante 30 min en buffer de unión (12% glicerol, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT) que contenía 0.2 U/μL *SUPERase Inhibitor* (Ambion). Los complejos de RNA-proteína formados se resolvieron mediante electroforesis en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 4% utilizando TBE (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA) 0.5X como solución electrolito. Tras la electroforesis, los complejos RNA-proteína se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (BrighStar-Plus, Ambion) durante 60 min a 200 mA en TBE 0.5X, utilizando el sistema de electrotransferencia *MINI-PROTEAN II* (BioRad). Finalmente, el RNA biotinado se detectó utilizando el *BrightStar BioDetect kit* (Ambion), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1. Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes en geles SDS-PAGE según lo descrito previamente (Laemmli, 1970). En general, las muestras se resuspendieron en tampón de disociación *NuPAGE Sample Buffer* (Novex, Life Technologies) con 100 mM DTT y se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles comerciales en gradiente *NuPAGE 4-12% Bis-Tris* (Novex, Life Technologies) utilizando *NuPAGE MOPS SDS Running Buffer* (Novex, Life Technologies) como solución electrolito. Cuando fue necesario, las proteínas se visualizaron mediante

tinción con azul de Coomassie utilizando el reactivo *EZBlue Gel Staining Reagent* (Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.2. Transferencia electroforética de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección (*Western blot*)

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond-C Extra nitrocellulose membrana*, GE Healthcare) durante 60 min a 100 V en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.8, 192 mM glicina, 20% metanol), utilizando un sistema de electrotransferencia *MINI-PROTEAN II* (BioRad). Una vez trasferidas las proteínas, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% en TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) y se incubaron con los anticuerpos específicos (Tabla IV), diluidos en TTBS con leche en polvo al 3%, durante 1h a temperatura ambiente o durante 12 h a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa (Tabla IV) diluido en TTBS con leche en polvo al 3% durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, después de lavar exhaustivamente las membranas con TTBS, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el reactivo *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) y un captador de imágenes *ChemiDoc XRS⁺ System* (BioRad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las proteínas fueron cuantificadas mediante análisis densitométrico utilizando el programa *Image Lab 4.1* (BioRad).

6.3. Marcaje metabólico de proteínas

Monocapas de células ST se infectaron a una mdi de 5 UFP/célula con los diferentes virus recombinantes. A diferentes tiempos después de la infección, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron a 37°C durante 2 h en medio DMEN sin metionina ni cisteína suplementado con SFT al 2% y 100 µCi/mL de una mezcla de metionina y cisteína marcadas radiactivamente con ³⁵S (Perkin Elmer). Transcurrido el tiempo de marcaje, se retiró el medio, se lavaron las células tres veces con PBS y se recogieron en solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM NaCl, 2 mM EDTA, NP-40 al 1%) suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete*, Roche),

10 U de DNasa I (Roche) y 10 U de RNasa A (QIAGEN). El material no solubilizado se eliminó por centrifugación y los extractos celulares resultantes se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE, como se describe en el apartado 6.1 de esta sección. Para visualizar las proteínas marcadas radiactivamente, los geles se secaron en vacío a -80°C y se expusieron en películas autorradiográficas, siguiendo las indicaciones del proveedor. Finalmente, las proteínas fueron cuantificadas mediante análisis densitométrico utilizando un captador de imágenes *ChemiDoc XRS⁺ System* (BioRad) y el programa *Image Lab 4.1* (BioRad).

Tabla IV. Anticuerpos utilizados en este trabajo

Anticuerpo ^(a)	Especie ^(b)	Procedencia ^(c)	Diluciones de Trabajo ^(d)	
			WB	RIP
Acp anti-EPRS	Conejo	Abcam	1:2500	1:20
Acp anti-RRS	Conejo	Abcam	1:4000	1:20
Acp anti-hnRNP A0	Cabra	S. Cruz Biotech.	1:500	ND
Acp anti-hnRNP A1	Conejo	S. Cruz Biotech.	1:1000	ND
Acm anti-hnRNP Q	Ratón	S. Cruz Biotech.	1:200	ND
Acp anti-hnRNP U	Conejo	Abcam	1:1000	ND
Acp anti-p100	Cobaya	Progen Biotechnik	1:4000	ND
Acp anti-PABP	Conejo	Dra. A. Nieto	1:2500	ND
Acm anti-Actina	Ratón	Abcam	1:10000	ND
Acm anti-MDA5	Conejo	Cell Signaling	1:250	ND
Acp anti-RIG-I	Conejo	AnaSpec	1:250	ND
Acp anti-GFP	Ratón	Roche	ND	1:20
Acm anti-N (3DC10)	Ratón	Laboratorio	1:2000	ND
Acp anti-GRP78	Conejo	Abcam	1:4000	ND
Anti-ratón IgG-peroxidasa	Cabra	Sigma	1:20000	-
Anti-conejo IgG-peroxidasa	Cabra	Sigma	1:20000	-
Anti cobaya-peroxidasa	Conejo	Sigma	1:15000	-

(a) Acm, Anticuerpo monoclonal; Acp, Anticuerpo policlonal.

(b) Especie animal en la que se generó el anticuerpo.

(c) Casas comerciales o laboratorios de donde se obtuvieron los anticuerpos. Dra. Amelia Nieto, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España.

(d) Se indica la técnica en la que se utilizan los anticuerpos y la dilución de trabajo. WB, *Western Blot*; RIP, inmunoprecipitación de RNA; ND, no determinado.

7. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE RNA VIRALES QUE INTERACCIONAN CON PROTEINAS CELULARES

7.1. Síntesis y purificación de los RNAs biotinados utilizados como cebo en la cromatografía de afinidad a RNA

Los RNAs correspondientes a los extremos del genoma viral y a los fragmentos F1 a F6 del extremo 3' del genoma, se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* de moldes de DNA generados mediante PCR utilizando la enzima *Platinum Pfx DNA polymerase* (Life Technologies), oligonucleótidos específicos (Tabla V) y el plásmido pML33L-637G (Galán y col., 2009) como molde.

Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para la generación de moldes de DNA para transcripción

Oligo. ^(a)	Secuencia 5' → 3' ^(b)	Posición ^(c)
Xmal-Sp6-5'-VS	CGCGCCCGGG ATTAGGTGACACTATA(G) ACTTTTAAAGTAAAG TGAGTGTAGC	1-25
5'TGEV-504-RS	CACCAATGACGTAGTGATCCTTACG	480-504
Xmal-T7-VS	CGCGCCCGGG TAATACGACTCACTATA(G) GGATGCTGTATTTAT TACAGTTTTAATC	28093-28118
TGEV-3'-RS	GTATCACTATCAAAAGGAAAATTTCAAACAATTTTAC	28549-28586
TGEV-3'-pA-RS	<u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> GTATCACTATCAAAAGG	28570-28586
F1-RS	CTATATAAGATATTTAAAGTCATTGACAGTTTTAAGATTG	28175-28213
F2-VS	CGCGCCCGGG TAATACGACTCACTATA(G) GGACTATTACTTAAT CACTCTTCAAT	28154-28178
F2-RS	GCAAAATCCTAGTAAGACTAGAAAGATTACTCGAAGC	28247-28283
F3-VS	CGCGCCCGGG TAATACGACTCACTATA(G) GGATTTTGCTGCTAC AGATTGTTAG	28277-28299
F3-RS	GTGCTTACCATTCTGTACAAGAGTAGACAGCG	28363-28394
F4-VS	CGCGCCCGGG TAATACGACTCACTATA(G) GGCTGTCTACTCTTG TACAGAATGGTA	28365-28389
F4-RS	CTTTAACTTCTCTAAATTACTAAATCTAGCATTGC	28452-28487
F5-VS	CGCGCCCGGG TAATACGACTCACTATA(G) GGTTAGTCACATTAA TGTAAGGCAAC	28196-28319
F5-RS	CTAATATGCAATAGGGTTGCTGTACCTCCTATTAC	28397-28432
F6-VS	CGCGCCCGGG TAATACGACTCACTATA(G) GGAGAAGTTTAAAG ATCCGCTACGA	28476-28498

(a) VS, sentido viral o polaridad positiva; RS, sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) Los promotores de transcripción se indican en negrita. Los sitios de iniciación de la transcripción aparecen entre paréntesis. La secuencia correspondiente al poliA está subrayada.

(c) Posición en el genoma del TGEV. En los oligonucleótidos de sentido antiviral se indica la posición de la secuencia complementaria.

El molde de DNA para la transcripción *in vitro* de los primeros 504 nt del extremo 5', se generó usando los oligonucleótidos Xmal-SP6-5'-VS (incluye el promotor de la polimerasa del fago SP6) y 5'TGEV-504-RS (Tabla V). Para amplificar los moldes de DNA utilizados para sintetizar los últimos 493 nt del genoma viral con o sin poliA (25 nt), se utilizaron el oligonucleótido Xmal-T7-VS (incluye el promotor de la polimerasa del fago T7) y los oligonucleótidos TGEV-3'-polyA-RS para generar el extremo 3' con poliA o TGEV-3'-RS para sintetizar el extremo 3' sin poliA (Tabla V). Finalmente, los moldes de DNA para sintetizar los RNAs F1 a F6 se generaron utilizando los oligonucleótidos Xmal-T7-VS y F1-RS para el F1, F2-VS y F2-RS para el F2, F3-VS y F3-RS para el F3, F4-VS y F4-RS para el F4, F5-VS y F5-RS para el F5, y F6-VS y TGEV-3'-RS para el F6 (Tabla V). En todos los casos, los oligonucleótidos de polaridad positiva (VS) utilizados para amplificar los fragmentos F1 a F6 contenían la secuencia del promotor de la polimerasa del fago T7 para permitir su posterior transcripción *in vitro*.

Los moldes de DNA generados se purificaron utilizando el reactivo *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), siguiendo el protocolo indicado para purificación de fragmentos de PCR, y se utilizaron como moldes en las reacciones de transcripción *in vitro*. Para ello, 600 ng de cada DNA molde se transcribieron utilizando el reactivo *SP6/T7 Transcription kit* (Roche), según las condiciones del fabricante, con la polimerasa adecuada según el promotor de transcripción en cada caso. Con el fin de marcar los transcritos con biotina, la reacción de transcripción se realizó en presencia de Biotin-14-CTP (Life Technologies) en una proporción 1:6.25 respecto al CTP no marcado, quedando a una concentración final de 0.16 mM. Las reacciones se incubaron durante 2 h a 37°C y se trataron con 10 U de DNasa I (Roche) durante 30 min a 37°C para eliminar el molde de DNA. Finalmente, los transcritos generados se purificaron utilizando el reactivo *RNeasy mini kit* (QIAGEN), se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de agarosa al 2.5%, se cuantificaron espectrofotométricamente y se guardaron a -70°C hasta su uso.

Por otra parte, los fragmentos de RNA F2.1, F2.2, F2.3, F2.2U, F2.2D, F2.2L, F2.2R, mutC y mutG (Tabla VI), fueron sintetizados químicamente por la compañía Sigma y marcados con biotina en el extremo 3'.

Taba VI. RNAs biotinados sintetizados químicamente

RNA	Secuencia 5' → 3' ^(a)	Posición ^(b)
F2.1	AGACUAAUACUAAUACACUCUUUCAUACUAAAAGUGGUGCUUCGAGUAAU	-
F2.2	AUCUUAACUGUCAAGACUUUAAUACUUAUAGGAGUUUAGCAGA AACCAGAU	28177-28233
F2.3	CUUUCUAGUCUUACUAGGAUUUUGCU	28259-28284
F2.2U	GACUUUAAUACUUAUAGGAGUU	28194-28218
F2.2D	AAUCUUAACUGUCAAGUUAGCAGAAACCAGAUU	-
F2.2L	AAUCUUAACUGUCAAGACUUUAAUACUU	28176-28207
F2.2R	AUAUAGGAGUUUAGCAGAAACCAGAUU	28208-28234
mutC	AAUCUUAAC C GUCAAGACUUUAAUACUU	28176-28207
mutG	AAUCUUAAG G ACGUCAAGAUUUUAAUACUU	28176-28207

(a) Las mutaciones introducidas en el mutC y mutG con respecto al RNA F2.2L se indican en negrita.

(b) Posición en el genoma del TGEV. Los RNAs F2.1 y F2.2D comprenden regiones discontinuas en el genoma.

7.2. Preparación de extractos de proteínas citoplasmáticas utilizados en la cromatografía de afinidad a RNA

Monocapas confluentes de células humanas Huh-7 se infectaron con el aislado PUR46-C11 del TGEV a una mdi de 5 UFP/célula. A las 16 hdi las células se lavaron 2 veces con PBS a 4°C, se desprendieron con una espátula, se centrifugaron a 500 xg durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en tampón de extracción (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT y la mezcla de inhibidores de proteasas *Complete* de Roche) a una concentración de 1×10^8 células/mL, y se lisaron a 4°C durante 15 min. A continuación, se añadió NP-40 a una concentración final del 0.7% y después de agitar en vortex 10 seg, los núcleos se eliminaron por centrifugación a 13000 xg durante 30 seg. Finalmente, se añadió glicerol al sobrenadante hasta una concentración final del 10%, se determinó la concentración de proteínas con el reactivo *BCATM Protein Assay Kit* (Pierce) y los extractos citoplasmáticos se guardaron a -70°C hasta su uso.

7.3. Cromatografía de afinidad a RNA

La captura de proteínas por afinidad a RNA se realizó en tubos de PCR utilizando como matriz *Streptavidin Sepharose High Performance* (Amersham), según lo descrito previamente (Galán y col., 2009) con ligeras modificaciones. Antes de realizar la cromatografía de afinidad a RNA, 600 µg de extractos de proteínas citoplasmáticas,

diluidas 1:1 en solución de unión (50 mM HEPES pH 7.9, 150 mM KCl, 5% glicerol y 0.01% NP-40), se preaclaron tres veces con 20 μ L de resina con el fin de eliminar las proteínas que se unían inespecíficamente a la resina. Los pasos de preaclorado se realizaron durante 4 h, después de los cuales se eliminó la resina y el extracto de proteínas se transfirió a un tubo nuevo con resina, repitiendo el proceso 3 veces. En paralelo al último paso de preaclorado, el RNA biotinado (10 μ g) (Tabla VI) se diluyó en 200 μ L de la solución de unión de RNA (5 mM HEPES pH 7.9, 0.5 mM EDTA, 1 M KCl) y se inmovilizó a la resina mediante su incubación con 20 μ L de resina durante 1 h a 4°C. Posteriormente, la resina con el RNA inmovilizado se lavó 3 veces con la solución de unión para eliminar el exceso de sal y se incubó durante toda la noche a 4°C con los extractos de proteínas preaclorados. Finalmente, los complejos RNA-proteína se aislaron por centrifugación, se lavaron 3 veces con solución de unión y las proteínas unidas al RNA se disociaron mediante incubación a 65°C durante 10 min con 20 μ L de tampón de muestra *NuPAGE LDS Sample Buffer* (Novex, Life Technologies) con 100 mM DTT. La resina se centrifugó, se recuperó el sobrenadante y se realizó una segunda elución con 12 μ L de tampón de muestra, que se mezcló con el primer sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su análisis. Todas las incubaciones se realizaron a 4°C en un agitador orbital, sedimentando la resina por centrifugación a 500 \times g durante 1 min utilizando un rotor basculante.

8. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO TRADUCCIONAL

8.1. Construcción de los plásmidos pTNT-Luc-Cp, pTNT-Luc-TGEV y pTNT-Luc

Los plásmidos pTNT-Luc-Cp, pTNT-Luc-TGEV y pTNT-Luc se construyeron con el fin de analizar el efecto en traducción del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT. Estos plásmidos expresan, bajo el promotor de T7, tres mRNAs quiméricos que codifican el gen de la luciferasa, los cuales contienen en la región 3' UTR el elemento GAIT de la ceruloplasmina (Cp), el motivo del TGEV similar al elemento GAIT o ningún elemento GAIT, respectivamente. El plásmido pTNT-Luc-Cp se generó clonando en el vector pTNT, previamente digerido con Mlu I y Not I, un fragmento de DNA sintético (GeneArt, Life Technologies) que contenía el sitio de restricción Mlu I, el gen de la luciferasa, los primeros 48 nt de la región 3' UTR del mRNA de la luciferasa, un sitio de

clonaje múltiple y los 29 nt del elemento GAIT de la Cp flanqueados por las dianas de restricción Sal I y Not I. Para generar el plásmido pTNT-Luc-TGEV, el fragmento de DNA Sal I-Not I del plásmido pTNT-Luc-Cp se intercambió por un fragmento de DNA sintetizado químicamente (GeneArt, Life Technologies) que contenía los 32 nt del motivo de RNA del TGEV similar al elemento GAIT flanqueados por los sitios de restricción Sal I y Not I. Finalmente, el plásmido pTNT-Luc, que no contiene ningún elemento GAIT, se generó mediante la religación del plásmido pTNT-Luc-Cp digerido con Sal I y Not I y tratado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.

8.2. Síntesis y purificación de mRNAs quiméricos de la luciferasa

Los diferentes mRNAs quiméricos de la luciferasa se generaron mediante transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos pTNT-Luc-Cp, pTNT-Luc-TGEV y pTNT-Luc digeridos con Bam HI. Para ello, 500 ng de cada DNA molde se transcribieron *in vitro* con la polimerasa del fago T7 utilizando el reactivo *mMESSAGE mMACHINE T7 kit* (Ambion), según las indicaciones del fabricante. Este reactivo permite además, la incorporación de la estructura cap a los transcritos sintetizados. Posteriormente, los transcritos generados se purificaron utilizando el reactivo *RNeasy mini kit* (QIAGEN), se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de agarosa al 2.5%, se cuantificaron espectrofotométricamente y se guardaron a -70°C hasta su uso.

8.3. Preparación de extractos citoplasmáticos de células U937

Para preparar extractos citoplasmáticos de células monocíticas humanas U937, 1×10^7 células crecidas en RPMI-1640 con SFT al 10%, se incubaron en 10 mL de RPMI-1640 con SFT al 0.5% durante 1 h a 37°C y posteriormente, se trataron o no se trataron con 500 U/mL de IFN- γ recombinante humano (R&D System) durante 24 h a 37°C. El tratamiento con IFN- γ induce la formación del complejo proteico GAIT. Tras el tratamiento, las células se desprendieron con una espátula, se centrifugaron a 1500 $\times g$ durante 5 min a 4°C, se lavaron con PBS, se resuspendieron en 1 mL de *PhoshoSafe Extraction Reagent* (Novagen) al que se le había añadido previamente una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete*, Roche), y se lisaron a 4°C durante 5 min. A continuación, el lisado celular se centrifugó a 16000 $\times g$ durante 5 min a 4°C, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas con el

reactivo *BCATM Protein Assay Kit* (Pierce).

8.4. Traducción *in vitro* y evaluación de la actividad luciferasa

La traducción de los diferentes transcritos quiméricos de la luciferasa se evaluó *in vitro* en presencia o ausencia del complejo proteico GAIT utilizando lisados de reticulocito de conejo. Para ello, 200 ng de cada transcrito quimérico se tradujeron con 35 μ L de lisado de reticulocito de conejo (Promega) en presencia de 4 μ g de extractos citoplasmáticos de células U937 tratadas (contienen el complejo GAIT) o no tratadas (no contienen el complejo GAIT) con IFN- γ , 1 μ M de todos los aminoácidos, y 40 U de *RNasin Ribonuclease Inhibitor* (Promega). Las reacciones de traducción se realizaron a 30°C durante 90 min en un volumen final de 50 μ L. Finalizadas las reacciones, la eficiencia de la traducción se analizó mediante la cuantificación de la actividad luciferasa con el reactivo *Luciferase Assay System* (Promega) usando un luminómetro *Orion Microplate* (Berthold Detection System), según las indicaciones del fabricante.

9. GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES DEL TGEV

9.1. Construcción de los clones infectivos pBAC-TGEV-mutC y pBAC-TGEV-mutG

Los clones infectivos del TGEV pBAC-TGEV-mutC y pBAC-TGEV-mutG, los cuales presentan el motivo de RNA similar al elemento GAIT mutado, se generaron a partir del clon infectivo pBAC-TGEV^{FL}-S_{PTV} que contiene el gen S del aislado respiratorio tipo purdue del TGEV (Sánchez y col., 1999; Almazán y col., 2000; Cruz y col., 2011). Para ello, se generaron mediante síntesis química (GeneArt, Life Technologies) dos fragmentos de DNA, mutC y mutG, que abarcan los últimos 727 nt del genoma viral flanqueados por los sitios de restricción Kpn I y Bam HI. El fragmento mutC contenía una mutación puntual U \rightarrow C en posición genómica 28181 y el fragmento mutG contenía la misma mutación mas dos mutaciones puntuales adicionales A \rightarrow G y C \rightarrow U en las posiciones genómicas 28178 y 28190, las cuales destruían parcialmente la estructura secundaria predicha del motivo de RNA. A continuación, ambos fragmentos se digirieron con Kpn I y Bam HI y se clonaron en el plásmido intermedio pSL-3EMN7 (contiene la región del genoma de TGEV comprendida entre los

nucleótidos 20372 y 28087) (Penzes y col., 2001) digerido con las mismas enzimas de restricción, generándose los plásmidos pSL-3EMN7-mutC y pSL-3EMN7-mutG. Finalmente, los plásmido pBAC-TGEV-mutC y pBAC-TGEV-mutG se generaron mediante la sustitución del fragmento de DNA Mlu I-BamH I del clon infectivo pBAC-TGEV^{FL}-S_{PTV} por el fragmento correspondiente de los plásmidos pSL-3EMN7-mutC y pSL-3EMN7-mutG, los cuales contenían el motivo de RNA similar al elemento GAIT mutado. En todos los casos los diferentes pases de clonaje fueron chequeados mediante análisis de restricción y secuenciación.

9.2. Rescate de virus recombinantes a partir de los clones de cDNA infectivos

Para rescatar virus recombinantes del TGEV a partir de los clones infectivos, células BHK-pAPN crecidas al 90% de confluencia en placas de 35-mm de diámetro en medio DMEM, 10% SFT y sin antibióticos, se transfectaron con 4 µg de los clones infectivos usando 12 µL de *Lipofectamina 2000* (Life Technologies), según las especificaciones del fabricante. Después de un periodo de incubación de 6 h a 37°C, las células se levantaron con tripsina, se añadieron sobre una monocapa confluyente de células ST crecidas en placas de 35-mm de diámetro, y se incubaron a 37°C durante 72 h o hasta que se detectará un efecto citopático superior al 50%. Posteriormente, el sobrenadante de las células se recogió y los virus recombinantes rescatados se clonaron mediante tres pasos sucesivos de purificación de placas de lisis en medio semisólido con 0.6% de agarosa. Finalmente, los virus clonados se amplificaron y se titularon en células ST siguiendo protocolos previamente descritos (Jiménez y col., 1986).

10. METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

10.1. Efecto del silenciamiento de las proteínas RRS y p100 sobre la infección por el TGEV

El silenciamiento génico se llevó a cabo utilizando células Huh-7 y la tecnología de siRNAs. Por cada pocillo de una placa multipocillo de 24 pocillos, 5 x 10⁴ células crecidas en medio DMEM con 10% de SFT y sin antibióticos se transfectaron mediante transfección reversa con 10 nM de los siRNAs (*Silencer® Select*

siRNAs, Ambion, Life Technologies) (Tabla VII) y 2 μL del reactivo *siPORT Amine* (Ambion) diluido en 25 μL de medio Opti-MEM I (Gibco), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las células transfectadas se sembraron en placas de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo) en medio DMEM con 10% de SFT y sin antibióticos y se infectaron 48 h después con el aislado PUR46-C11 del TGEV a una mdi de 5 UFP/célula. A las 36 y 72 hdi, el RNA, las proteínas y el virus extracelular se recogieron para su posterior análisis. La expresión de los genes celulares silenciados y la síntesis del RNA viral se cuantificó por RT-qPCR como se describe en el apartado 5.3 de esta sección y la producción viral se determinó mediante titulación en células ST (Jiménez y col., 1986).

10.2. Efecto del silenciamiento de MDA5 y RIG-I en la respuesta antiviral frente al TGEV

El papel de ambos sensores citoplásmicos en la respuesta antiviral frente al TGEV se evaluó en células ST mediante silenciamiento génico. Para ello, células ST se transfectaron dos veces con *siRNAs* específicos (*Silencer® Select siRNAs*, Life Technologies) siguiendo el protocolo de transfección reversa. Para cada pocillo de una placa multipocillo de 6 pocillos, 8.4×10^5 células crecidas en medio DMEM con 10% de SFT y sin antibióticos se transfectaron en suspensión con 25 nM de los *siRNAs* específicos para MDA5 y RIG-I (Tabla VII) y 8 μL del reactivo *siPORT Amine* (Life Technologies) diluido en 100 μL de medio Opti-MEM I (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor. Como control negativo se usó un *siRNA* irrelevante que previamente se había descrito para células porcinas (Tabla VII). Después de la transfección, las células se sembraron en DMEM con 10% de SFT y sin antibióticos en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C durante 48 h. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas, se volvieron a transfectar con 25 nM de cada *siRNA*, se sembraron en placas de 24 pocillos a una relación de 2×10^5 células por pocillo, se incubaron a 37°C durante 24 h. Finalmente, el medio de transfección se eliminó y las células se infectaron con los virus rTGEV-wt y rTGEV-mutG a una mdi de 3 UFP/célula. A las 12 y 18 hdi (36 y 42 h después de la segunda transfección, respectivamente), el RNA y las proteínas se recogieron para cuantificar la expresión de IFN- β , TNF y de los genes silenciados, así como los niveles de RNA viral mediante RT-qPCR, como se

describe en el apartado 5.3 de esta sección.

Tabla VII. siRNAs utilizados en este trabajo

siRNA ID ^(a)	Gen	Especie	Secuencia 5→3' del siRNA ^(b)
s11811	RRS	Humana	GGU UAA AUC AUG UAG GAG Att UCU CCU ACA UGA UUU AAC Ctg
s25749	p100	Humana	CCA CCG UGU UGC AGA UAU Att UAU AUC UGC AAC ACG GUG Gtg
#4390843	Negativo	Humana	Control negativo comercial, secuencia no disponible
Custom	MDA5	Porcina	CCC AGA AUA UGA AAA UGA Att UUC AUU UUC AUA UUC UGG Gtt
Custom	RIG-I	Porcina	CAG UCA GAG ACA ACU UGG Att UCC AAG UUG UCU CUG ACU Gtt
Custom	Negativo	Porcina	CUG CCC CAG CGA UAU CCA Gtt CUG GAU AUC GCU GGG GCA Gtt

(a) ID proporcionado por el fabricante (Life Technologies).

(b) Las secuencias de polaridad positiva y negativa se muestran en las filas superiores e inferiores, respectivamente. Todos los siRNAs usados son dúplex sintéticos de 21 nt con 2 nt protuberantes en el extremo 3' (secuencia en minúscula).

11. ENSAYO DE SENSIBILIDAD A IFN- β

Para evaluar la sensibilidad a IFN- β de los virus rTGEV-wt y rTGEV-mutG, monocapas de células ST se trataron o no se trataron con 4 ng/10⁶ células de IFN- β porcino (Kingfisher Biotech) durante 16 h y posteriormente se infectaron con los diferentes virus recombinantes a una mdi de 3 UFP/célula. A las 8 hdi, el RNA total de células infectadas y no infectadas se purificó utilizando el reactivo *RNeasy mini kit* (QIAGEN) para su posterior análisis mediante RT-qPCR como se describe en el apartado 5.3 de esta sección.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar las diferencias en los valores medios entre los distintos grupos se utilizó el test de la *t* de Student. Todos los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar y se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de *P* fue inferior a 0.05.

1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON EL EXTREMO 3' DEL GENOMA DEL TGEV

La síntesis de RNA en CoV requiere el reconocimiento específico por proteínas virales y celulares de elementos de RNA en *cis* localizados en los extremos 5' y 3' del genoma (Ziebuhr, 2005; Enjuanes y col., 2006; Sola y col., 2011b), como se ha descrito para otros virus RNA de cadena positiva. En trabajos previos del laboratorio se identificaron nueve proteínas celulares potencialmente implicadas en la síntesis de RNA de CoVs en base a su interacción con los últimos 493 nt del extremo 3' del genoma del TGEV. Estas proteínas incluían las hnRNPs A0, A1, A2/B1, Q y U, los factores de traducción EPRS, RRS y PABP, y el coactivador de la transcripción p100 (Galán y col., 2009). El papel funcional de algunas de estas proteínas en la síntesis de RNA se analizó mediante experimentos de silenciamiento génico, demostrándose que las proteínas hnRNP Q, EPRS y PABP juegan un papel positivo en la síntesis de RNA de CoV (Galán y col., 2009). En esta tesis doctoral, estos estudios funcionales se han extendido a las proteínas RRS y p100.

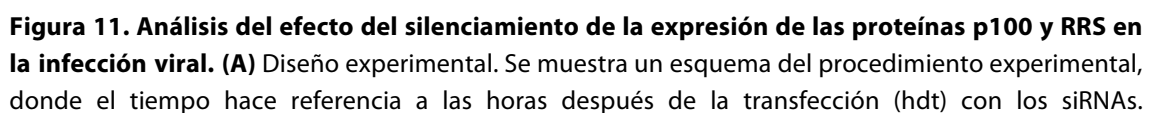
Con el fin de analizar la relevancia funcional de las proteínas RRS y p100 en la replicación del TGEV, se silenció su expresión con siRNAs específicos para cada gen (Tabla VII) y se evaluó el efecto de su silenciamiento en la síntesis de RNA viral y en la producción de virus infeccioso. Para llevar a cabo este estudio se seleccionó la línea celular humana Huh-7 por su susceptibilidad a la infección por el aislado PUR46-C11 del TGEV y por la disponibilidad de siRNAs y ensayos TaqMan prediseñados y validados para estas proteínas humanas.

Inicialmente, se optimizó la transfección de los siRNAs y el intervalo de tiempo óptimo para el silenciamiento de los genes de las proteínas RRS y p100 utilizando dos siRNAs por gen. En las condiciones optimizadas, una sola transfección reversa fue suficiente para conseguir un silenciamiento significativo tanto a nivel de mRNA como de proteína. Por otra parte, de los dos siRNAs analizados para cada gen se seleccionó aquel que presentaba una mayor eficiencia de silenciamiento (el siRNA #2 para la RRS y el siRNA #1 para la p100) para llevar a cabo el ensayo (datos no mostrados) (Tabla VII).

Una vez optimizadas las condiciones de silenciamiento génico de las proteínas RRS y p100, se analizó su efecto en la síntesis de RNA viral y la producción de virus infectivo. Para ello, células Huh-7 se transfectaron mediante transfección reversa con 10 nM de cada siRNA específico para la p100 y la RRS y un siRNA validado irrelevante como control negativo (Tabla VII). A las 48 hdt, las células se infectaron con el aislado PUR46-C11 del TGEV a una mdi de 5 UFP/célula y transcurridas 36 y 72 hdi (84 y 120 hdt de los siRNAs, respectivamente) se recogieron muestras de RNA, proteína total y virus extracelular para evaluar el silenciamiento génico, la síntesis de RNA y la producción viral (Fig. 11A).

El silenciamiento a nivel de mRNA de los genes SND1 y RARS se analizó mediante RT-qPCR utilizando ensayos TaqMan específicos de cada gen (Tabla III), observándose una reducción en los niveles de mRNA de entre el 55 y el 60% para ambas proteínas tanto a las 48 hdt como a las 120 hdt (Fig. 11B). En consonancia con los datos obtenidos a nivel de mRNA, cuando el silenciamiento se analizó a nivel de proteína mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla IV), se observó una reducción de la expresión de las proteínas superior al 65% en ambos casos (Fig. 11C).

El efecto del silenciamiento de los genes diana sobre la síntesis de RNA viral se analizó a las 36 y 72 hdi (84 y 120 hdt de los siRNAs, respectivamente) cuantificando los niveles de sgRNA 7 viral mediante RT-qPCR utilizando un ensayo TaqMan específico (Tabla II). En ambos casos, se observó una reducción significativa y reproducible de más de 2 veces en los niveles de sgRNA 7 viral en las células silenciadas con respecto a los niveles obtenidos en células transfectadas con un siRNA irrelevante como control negativo (Fig. 11D). Finalmente, la producción viral se determinó mediante titulación en células ST. En este caso, el análisis sólo se realizó a las 72 hdi (120 hdt con los siRNAs) que es cuando se alcanzan los mayores títulos virales. En consonancia con los efectos observados en las síntesis del RNA viral, se detectó una reducción en los títulos virales del 40 y 45% en las células donde se había silenciado los genes de las proteínas la p100 y la RRS, respectivamente (Fig. 11D). En conjunto, estos resultados indicaban, que de forma similar a lo descrito para las proteínas hnRNP Q, EPRS y PABP (Galán y col., 2009), las proteínas celulares p100 y



(B) Análisis del silenciamiento génico a nivel de mRNA. El porcentaje del mRNA después del silenciamiento de los genes diana (se indica el siRNA utilizado para cada gen) se cuantificó a los tiempos indicados mediante RT-qPCR, en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante. **(C)** Análisis del silenciamiento génico a nivel de proteína. Los niveles de proteína después del silenciamiento de los genes indicados se cuantificaron a las 84 y 120 hdt de los siRNAs mediante *Western blot* en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante (NEG). La proteína β -actina se utilizó como control de carga. **(D)** Síntesis de RNA viral y producción viral en células silenciadas. La síntesis de RNA viral en las células silenciadas para los genes indicados se evaluó a los tiempos indicados mediante la cuantificación por RT-qPCR de los niveles del sgRNA del gen 7, los cuales se representan como las veces de cambio con respecto a los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante. La producción viral en células silenciadas se expresa como porcentaje con respecto a los títulos virales obtenidos en células transfectadas con un siRNA irrelevante. En todos los casos, los datos representan la media de tres experimentos independientes, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS DE RNA DEL EXTREMO 3' DEL GENOMA DEL TGEV QUE INTERACCIONAN CON LAS PROTEÍNAS CELULARES

Una vez demostrada una implicación funcional en la síntesis de RNA de CoV de la mayor parte de las proteínas celulares que interaccionan específicamente con el extremo 3' del genoma, se procedió a la identificación y caracterización de los dominios de RNA del extremo 3' del genoma viral implicados en estas interacciones. La información obtenida de estos estudios es de interés para el posterior análisis del mecanismo de acción de estas proteínas.

2.1. Estudio de la implicación de la cola de poliA en la unión de las proteínas celulares al extremo 3' del genoma del TGEV

Para identificar los dominios de RNA del extremo 3' del genoma que interaccionaban con las proteínas celulares PABP, EPRS, RRS, p100 y las hnRNPs Q, A1, U y A0, inicialmente, se analizó la posible implicación de la cola de poliA en estas interacciones mediante ensayos de cromatografía de afinidad a RNA y *Western blot*.

La cromatografía de afinidad a RNA se realizó utilizando tres RNAs sintéticos que contenían los primeros 504 nt del extremo 5' del genoma del TGEV (se utilizó como control negativo) y los últimos 493 nt del extremo 3' del genoma con y sin la cola de poliA (Fig. 12). Estos RNAs se sintetizaron mediante la transcripción *in vitro* de productos de PCR generados con oligonucleótidos específicos para cada extremo (Tabla V) utilizando como molde el plásmido pML33L-637G (Galán y col., 2009). Los

transcritos se marcaron con biotina durante la transcripción *in vitro* utilizando una relación molar 1:1.25 de biotina-14-CTP con respecto al nucleótido no marcado, con el fin de conseguir un marcaje espaciado y minimizar el posible efecto de los grupos de biotina sobre la conformación del RNA. Posteriormente los RNAs se inmovilizaron en una resina de sefarosa/estreptavidina, se incubaron con extractos citoplasmáticos de células Huh-7 infectadas con el aislado PUR46-C11 del TGEV como fuente de proteínas y los complejos RNA-proteína se aislaron mediante centrifugación (Fig. 12).

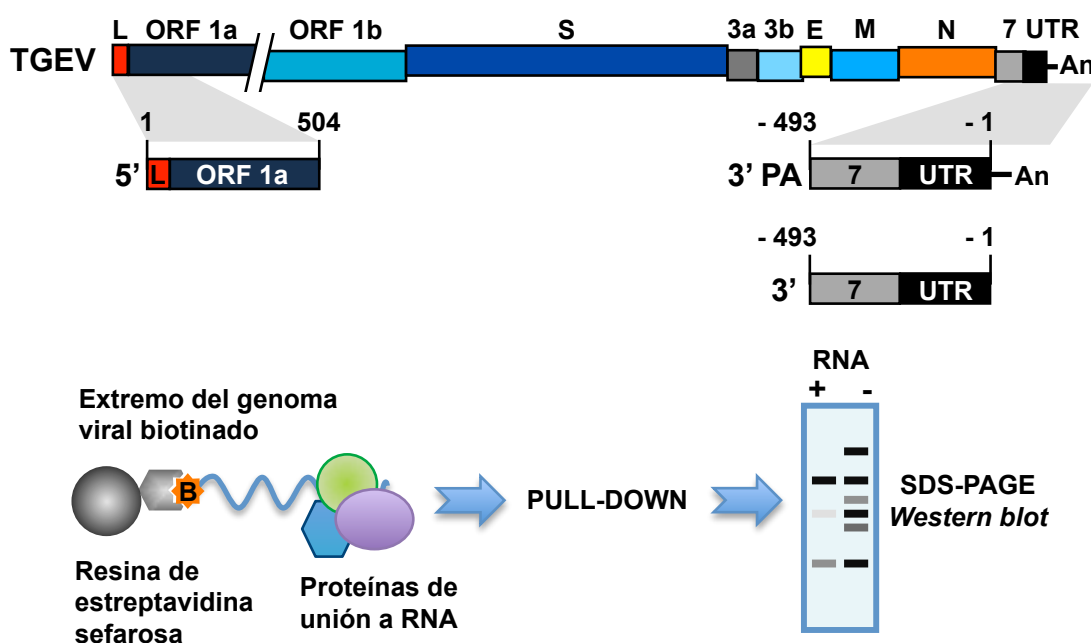


Figura 12. Esquema de la cromatografía de afinidad a RNA. En la parte superior se muestra el genoma del TGEV, donde se indican los genes virales (ORF1a, ORF1b, S, 3a, 3b, E, M, N, 7), la secuencia líder (L), la secuencia 3' UTR (UTR) y el poliA (An). Debajo del genoma viral se muestra el esquema y la posición genómica de los RNAs correspondientes al extremo 5' (5') y al extremo 3' con (3'PA) o sin la cola de poliA (3') utilizados en la cromatografía de afinidad a RNA. En la parte inferior se muestra el procedimiento seguido para el aislamiento de proteínas mediante cromatografía de afinidad a RNA y su posterior análisis mediante *Western blot*.

Finalmente, las proteínas aisladas por afinidad se analizaron mediante *Western blot* (Fig. 13) utilizando anticuerpos específicos para cada proteína (Tabla IV). Los datos obtenidos confirmaron la unión preferencial de todas las proteínas analizadas al extremo 3' del genoma con poliA con respecto al extremo 5', como había sido descrito previamente (Galán y col., 2009). Por otra parte, como era de esperar, la PABP se unía específicamente al extremo 3' con poliA y no al extremo 3' sin poliA. El

resto de proteínas analizadas interaccionaron con ambos extremos 3', con y sin la cola de poliA (Fig. 13), indicando que la interacción con el extremo 3' del genoma de las proteínas EPRS, RRS, p100, y las hnRNPs Q, A1, U y A0 no está mediada por la cola de poliA.

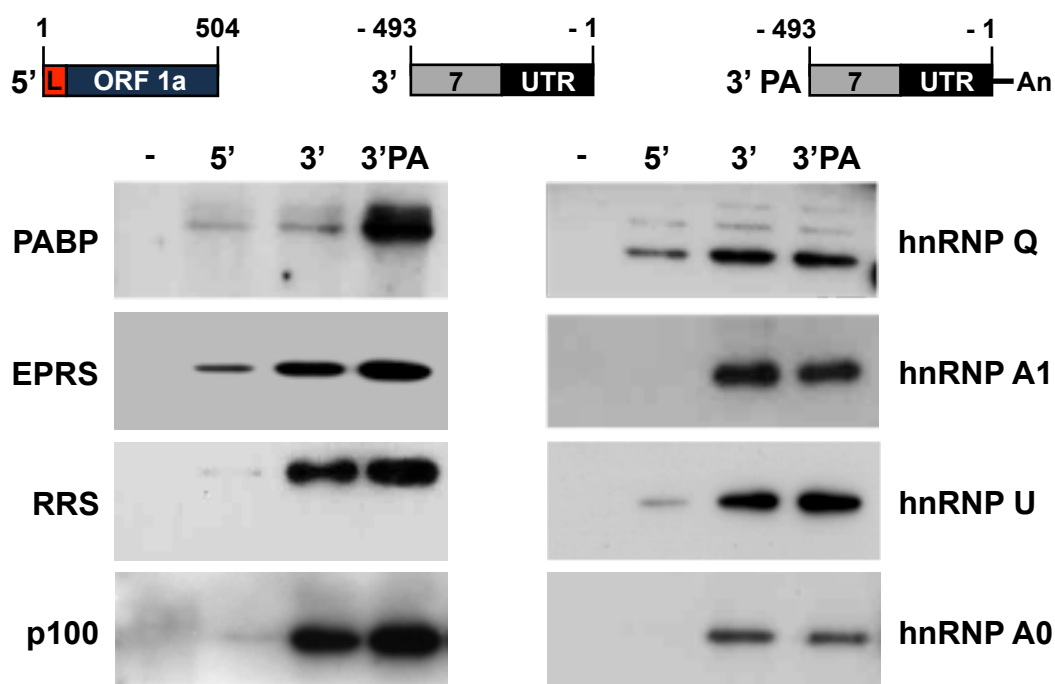


Figura 13. Relevancia de la cola de poliA en la unión de las proteínas celulares a extremo 3' del genoma del TGEV. En la parte superior se muestra el esquema de los RNAs utilizados en la cromatografía de afinidad a RNA, en donde los diferentes genes (ORF 1a y 7), la secuencia líder (L) y la secuencia 3' UTR (UTR) están representados como barras. Extractos proteicos citoplasmáticos (600 µg) de células Huh-7 infectadas con TGEV se incubaron sin RNA (-) o con RNAs sintéticos correspondientes al extremo 5' del genoma (5'), al extremo 3' sin poliA (3') o al extremo 3' con poliA (3'PA). Las proteínas unidas a los distintos RNAs se aislaron mediante cromatografía de afinidad a RNA y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos frente a las proteínas indicas.

2.2. Localización de los dominios de RNA del extremo 3' del TGEV que interaccionan con proteínas celulares

Una vez descartada la implicación del poliA en la interacción de las proteínas EPRS, RRS, p100, y las hnRNPs Q, A1, U y A0 con el extremo 3' del genoma viral, se procedió a identificar la región del extremo 3' del genoma del TGEV que contenían los dominios de RNA implicados en dicha unión. Con este fin, los últimos 493 nt del extremo 3' del genoma se dividieron en 6 fragmentos de RNA solapantes (F1 a F6)

(Fig. 14A). Estos fragmentos se seleccionaron teniendo en cuenta la estructura secundaria del extremo 3' del genoma predicha utilizando el programa Mfold 3.4. (Zuker, 2003) y los datos publicados sobre los elementos de RNA en *cis* del extremo 3' necesarios para la síntesis del RNA viral de CoVs. Los fragmentos F1 y F2, que abarcan las regiones genómicas comprendidas entre los nucleótidos 28087-28207 y 28147-28277, respectivamente, contenían cuatro SLs cuya función en el ciclo viral es desconocida. Los fragmentos F3, F4 y F5 (nucleótidos 28269-28388, 28358-28481 y 28289-28426, respectivamente) comprendían una región del genoma que contiene estructuras de RNA similares al BSL y al PK, descritas previamente en los virus MHV y BCoV como dos estructuras de RNA funcionalmente importantes en la síntesis de RNA de CoV (Hsue y Masters, 1997; Williams y col., 1999; Züst y col., 2008). Finalmente, el fragmento F6 que abarca los nucleótidos 28469-28,580, contiene la región HVR y el octanucleótido universalmente conservado en todos los CoVs (GGAAGAGC) (Züst y col., 2008; Madhugiri y col., 2014). Los fragmentos de RNA se generaron mediante transcripción *in vitro* a partir de moldes de DNA generados mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada fragmento (Tabla V) y el plásmido pML33L-637G como molde. Estos RNAs se marcaron con biotina durante la transcripción *in vitro*, se inmovilizaron en resinas de sefarosa/estreptavidina y se usaron como ligando en experimentos de cromatografía de afinidad a RNA utilizando extractos citoplasmáticos de células Huh-7 infectadas. En paralelo, la cromatografía de afinidad a RNA se realizó sin RNA o con los extremos completos 5' y 3' sin el poliA como controles de especificidad. Las proteínas aisladas por cromatografía de afinidad se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla IV) (Fig. 14B). Además de la unión preferencial de todas las proteínas analizadas con el extremo 3' del genoma sin poliA, se observó la unión específica de las proteínas EPRS y RRS con el fragmento F2 y la unión preferencial de la hnRNP A1 al fragmento F4 (Fig. 14B). En el caso de las hnRNPs Q y A0, estas proteínas se unieron preferencialmente a varios fragmentos de RNA, F2 y F6 en el caso de la hnRNP Q y F2 y F4 en el caso de la hnRNP A0 (Fig. 14B). Sin embargo, en el caso de las proteínas hnRNP U y p100 no se observó una unión preferencial por ninguno de los fragmento de RNA analizados en las condiciones experimentales utilizadas (Fig. 14B).

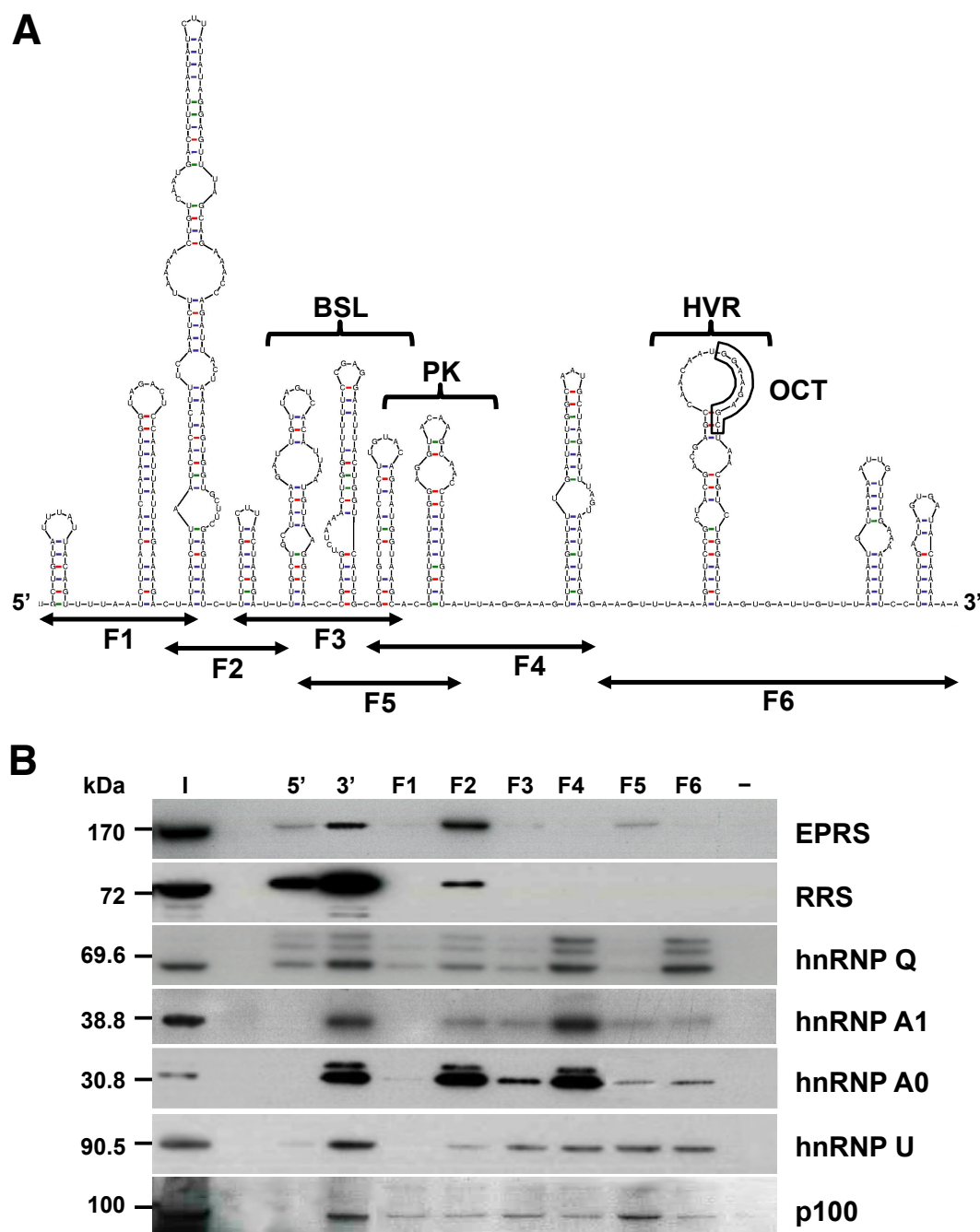


Figura 14. Mapeo de los dominios de RNA del extremo 3' que interaccionan con las proteínas celulares. (A) Estructura secundaria de los últimos 493 nt del extremo 3' del genoma del TGEV. Se muestra la estructura secundaria predicha con el programa Mfold 3.4, donde se indica la localización y secuencia de los seis fragmentos de RNA solapantes (F1 a F6), las estructuras de RNA similares al BSL y al PK, la región HVR y el octanucleótido (OCT) conservado en todos los CoVs. (B) Identificación de las regiones de RNA que interaccionan con las proteínas celulares. Se realizaron cromatografías de afinidad a RNA utilizando RNAs biotinados correspondientes a los seis fragmentos de RNA solapantes (F1 a F6) del extremo 3' del genoma viral y 600 µg de extractos citoplasmáticos de células Huh-7 infectadas con el TGEV. Como controles de especificidad, la cromatografía de afinidad también se realizó sin RNA (-), con el extremo 5' (5') o con el extremo 3' sin poliA (3'). Las proteínas aisladas se resolvieron electroforéticamente junto con 50 µg de extracto inicial (I) y se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos específicos frente a las proteínas indicadas. Las masas moleculares de las proteínas se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

Teniendo en cuenta la interacción específica observada de las proteínas EPRS y RRS con el fragmento de RNA F2, y que ambas proteínas están implicadas en la síntesis del RNA viral, el fragmento F2 se seleccionó con el fin de identificar los dominios de RNA que interaccionan con ambas aminoacil tRNA sintetasas.

2.3. Identificación de los dominios de RNA del genoma del TGEV que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS

Con el fin de identificar los dominios de RNA dentro del fragmento F2 responsables de la interacción de las proteínas EPRS y RRS con el extremo 3' del genoma del TGEV, en una primera aproximación, el fragmento F2 se subdividió en tres fragmentos de alrededor de 60 nt (F2.1, F2.2 y F2.3), teniendo en cuenta su estructura secundaria predicha (Fig. 15A). Estos fragmentos de RNA se sintetizaron químicamente y se marcaron con una sola molécula de biotina en el extremo 3' con el fin de minimizar el posible efecto de los grupos de biotina sobre la conformación del RNA. Posteriormente, los RNAs marcados con biotina se inmovilizaron en resinas de sefarosa/estreptavidina y se usaron como ligando en experimentos de cromatografía de afinidad a RNA como se ha descrito anteriormente. En paralelo, el ensayo se realizó con los fragmentos F2 y F3 como controles de especificidad. Finalmente, las proteínas aisladas por cromatografía de afinidad se separaron en geles de SDS-PAGE y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos frente a las proteínas EPRS y RRS (Tabla IV) (Fig. 15B). Además de la unión específica esperada de ambas proteínas con el fragmento F2, se observó que la RRS se unía específicamente al fragmento F2.2, siendo esta unión solamente preferencial en el caso de la EPRS (Fig. 15B).

Después de determinar que el fragmento F2.2 contenía los motivos de RNA que interaccionaban con ambas aminoacil tRNA sintetasas, este fragmento se dividió posteriormente en cuatro nuevos fragmentos de aproximadamente 30 nt (F2.2L, F2.2R, F2.2U y F2.2D) con el fin de identificar el motivo específico de RNA que interaccionaba con ambas proteínas. La división del fragmento F2 se realizó de acuerdo a su secuencia y a la predicción de su estructura secundaria, la cual consistía en una estructura de RNA compleja en forma de horquilla con dos *loops* internos (Fig. 16A). Los fragmentos F2.2L y F2.2R comprendían la mitad 5' y 3' del fragmento F2.2,

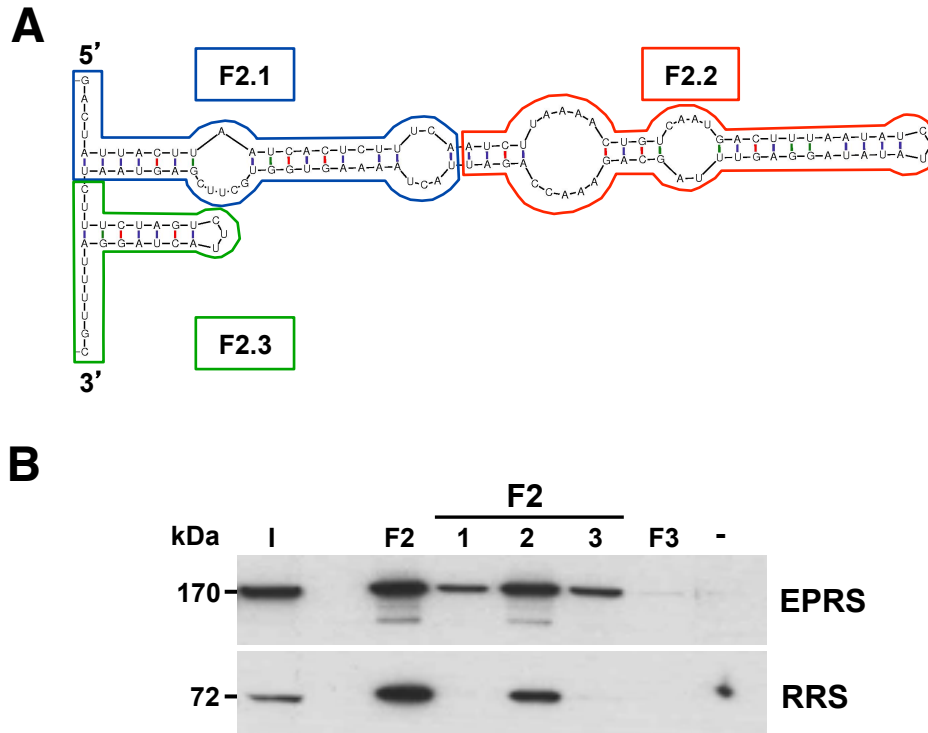


Figura 15. Mapeo de los dominios de RNA del fragmento F2 que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS. (A) Estructura secundaria del fragmento F2. Se muestra la estructura secundaria predicha con el programa Mfold 3.4, donde se indica la secuencia y estructura de los fragmentos de RNA F2.1, F2.2 y F2.3. **(B)** Análisis de los dominios de RNA que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS mediante cromatografía de afinidad a RNA y *Western blot*. Se realizaron cromatografías de afinidad a RNA utilizando RNAs biotinilados correspondientes a los fragmentos F2.1, F2.2 y F2.3 y 600 µg de extractos citoplasmáticos de células Huh-7 infectadas con el TGEV. Como controles de especificidad, el ensayo se realizó sin RNA (-) o con los fragmentos F2 y F3. La presencia de la EPRS y la RRS en el extracto inicial (I) y en las proteínas aisladas por cromatografía de afinidad se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos específicos. Las masas moleculares de las proteínas se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

respectivamente. El fragmento F2.2U contenía la secuencia que formaba el *stem* superior de la estructura y el F2.2D estaba compuesto de una secuencia discontinua en el genoma que contenía los dos *loops* internos (Fig. 16A). Los cuatro fragmentos de RNA se sintetizaron químicamente, se marcaron con biotina y se utilizaron como cebos, junto con el fragmento F2.2 como control de especificidad, en ensayos de cromatografía de afinidad a RNA. Las proteínas aisladas por cromatografía de afinidad se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se analizaron mediante *Western blot* (Fig. 16B). Además de la unión específica esperada de la EPRS y la RRS con el fragmento F2.2, se observó que ambas proteínas se unían preferentemente al fragmento F2.2L (Fig. 16B).

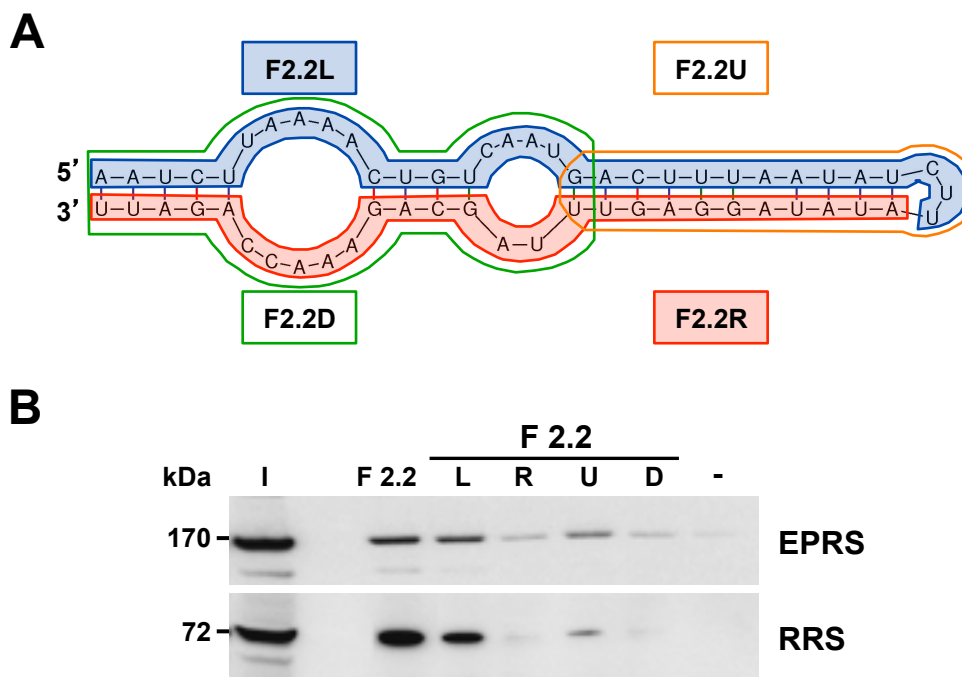


Figura 16. Mapeo de los dominios de RNA del fragmento F2 que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS. (A) Estructura secundaria del fragmento F2.2. Se muestra la estructura secundaria predicha con el programa Mfold 3.4, donde se indica la secuencia y estructura de los fragmentos de RNA F2.2L, F2.2R, F2.2U y F2.2D. **(B)** Identificación de los dominios de RNA que interaccionan con las proteínas EPRS y RRS mediante cromatografía de afinidad a RNA y *Western blot*. Se realizaron cromatografías de afinidad a RNA utilizando RNAs biotinilados correspondientes a los fragmentos F2.2L, F2.2R, F2.2U y F2.2D y 600 µg de extractos citoplasmáticos de células Huh-7 infectadas con el TGEV. Como controles de especificidad, el ensayo se realizó sin RNA (-) o con el fragmento F2.2. La presencia de la EPRS y la RRS en el extracto inicial (I) y en las proteínas aisladas por cromatografía de afinidad se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos específicos. Las masas moleculares de las proteínas se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

2.4. Análisis de la secuencia y estructura secundaria del fragmento F2.2L

El fragmento F2.2L comprende una secuencia de 32 nt localizada a 410 nt del extremo 3' del genoma viral que se encuentra dentro de la región codificante del gen 7 del TGEV (Fig. 17). El análisis detallado de la secuencia de este fragmento mostró que tenía mas de un 80% de identidad con el elemento GAIT del gen de la ceruloplasmina (Cp) (Fig. 17). El elemento GAIT es un motivo de RNA que se encuentra exclusivamente en la región 3' UTR de diversos mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias y está implicado en la modulación de la respuesta inflamatoria a nivel postranscripcional (Sampath y col., 2003; Mukhopadhyay y col., 2009). Después de la estimulación con IFN- γ se induce la formación del complejo

proteico GAIT (constituido por las proteínas EPRS, hnRNP Q, L13a y GAPDH) el cual, a través de la interacción con el elemento GAIT, inhibe la traducción de los mRNAs que lo contienen, favoreciendo de este modo la resolución de la inflamación.

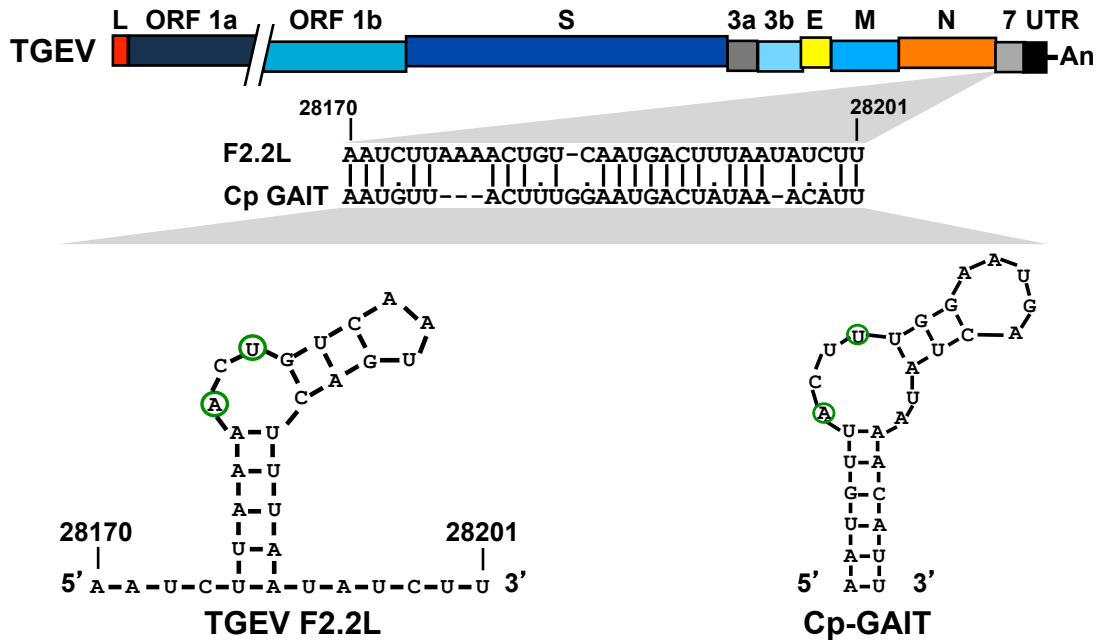


Figura 17. Análisis de la secuencia del fragmento F2.2L. En la parte superior se muestra el esquema del genoma del TGEV, donde se indican los genes virales (ORF1a, ORF1b, S, 3a, 3b, E, M, N, 7), la secuencia líder (L), la región 3' UTR (UTR) y la cola de poliA (An). En la parte inferior de la figura se muestra el alineamiento de las secuencias del fragmento F2.2L y del elemento GAIT de la Cp (Cp-GAIT) y sus estructuras secundarias respectivas con los residuos A y U críticos para la función del elemento GAIT incluidos dentro de un círculo verde. Los números situados sobre las secuencias y las estructuras secundarias indican la posición genómica del fragmento F2.2L.

Además de la homología a nivel de secuencia, la estructura secundaria del elemento GAIT celular, consistente en un SL con un *loop* interno asimétrico, estaba muy conservada en el dominio de RNA viral, incluyendo los residuos de adenina y uracilo localizados en el *loop* interno asimétrico (Fig. 17) que son críticos para la función del elemento GAIT celular (Sampath y col., 2003; Mukhopadhyay y col., 2009). En su conjunto, los datos obtenidos sugerían que el motivo de RNA viral contenido en el fragmento F2.2L podría constituir un motivo de RNA similar al elemento GAIT celular.

3. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA EPRS Y LA RRS CON EL MOTIVO DE RNA VIRAL SIMILAR AL ELEMENTO GAIT

3.1. Análisis *in vitro* de la interacción de las proteínas EPRS y RRS con el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT

Con el fin de determinar si la interacción observada de la EPRS y RRS con el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT es directa o indirecta, se llevó a cabo un ensayo EMSA utilizando proteínas purificadas comerciales y un oligonucleótido de RNA sintetizado químicamente y marcado con biotina que contenía el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT (Fig. 18). Como controles negativos se utilizaron la proteína GAPDH, que es una proteína del complejo GAIT que no interacciona directamente con el elemento GAIT, y el péptido DDK/MYC, dado que la EPRS utilizada en el ensayo estaba fusionada a este péptido en su extremo N-terminal.

TGEV-GAIT	+	+	+	+
EPRS	-	+	-	-
DDK/MYC	-	-	+	-
GAPDH	-	-	-	+

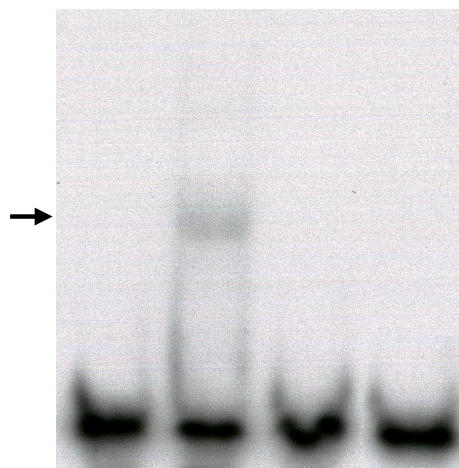


Figura 18. Análisis de la interacción entre la EPRS y el motivo de RNA similar al elemento GAIT mediante EMSA. Las proteínas EPRS, GAPDH y DDK/MYC se incubaron con el motivo de RNA similar al elemento GAIT (TGEV-GAIT) biotinado y los complejos RNA-proteína formados se resolvieron electroforéticamente. Tras la transferencia a membranas de nylon, el RNA marcado con biotina se detectó utilizando el reactivo *BrightStar BioDetect kit* (Ambion).

Desafortunadamente, la RRS purificada no entró en el gel nativo en las condiciones ensayadas en este experimento y por lo tanto no se pudieron obtener resultados acerca de la interacción de la RRS con el motivo de RNA viral mediante esta técnica. Sin embargo, se observó un retardo en la movilidad electroforética del motivo de RNA similar al elemento GAIT cuando este se incubó con la EPRS y no cuando se incubó con la proteína GAPDH o el péptido DDK/MYC (Fig. 18). Estos resultados indicaron que al menos la EPRS interaccionaba directa y específicamente con el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT *in vitro*, de forma similar a lo descrito para el elemento GAIT celular (Jia y col., 2008; Mukhopadhyay y col., 2009).

3.2. Análisis de la interacción de las proteínas EPRS y RRS con el RNA viral durante la infección

Con el fin de analizar si la interacción observada *in vitro* entre el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT y las proteínas celulares EPRS y RRS también ocurre durante el transcurso de la infección, esta interacción se analizó en células infectadas mediante ensayos de inmunoprecipitación de RNA asociado a proteína (Fig. 19). Para ello, extractos citoplasmáticos de células ST infectadas con el aislado PUR46-MAD del TGEV se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos frente a las proteínas EPRS, RRS y frente a la proteína verde fluorescente (GFP) como control de especificidad (Tabla IV). El RNA asociado a los complejos RNA-proteína inmunoprecipitados, se aisló utilizando el *RNeasy Mini kit* (QIAGEN) y la presencia del gRNA y de los sgmRNAs virales se analizó mediante RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla II). Tanto el gRNA como los sgmRNAs virales, que contienen el motivo de RNA similar al elemento GAIT en el extremo 3' se detectaron específicamente en los complejos RNA-proteína inmunoprecipitados con los anticuerpos específicos frente a las proteínas EPRS y RRS, a diferencia de las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo control frente a GFP (Fig. 19). Los datos obtenidos confirmaron que ambas aminoacil tRNA sintetasas interaccionaban específicamente con los RNAs virales durante la infección por el TGEV.

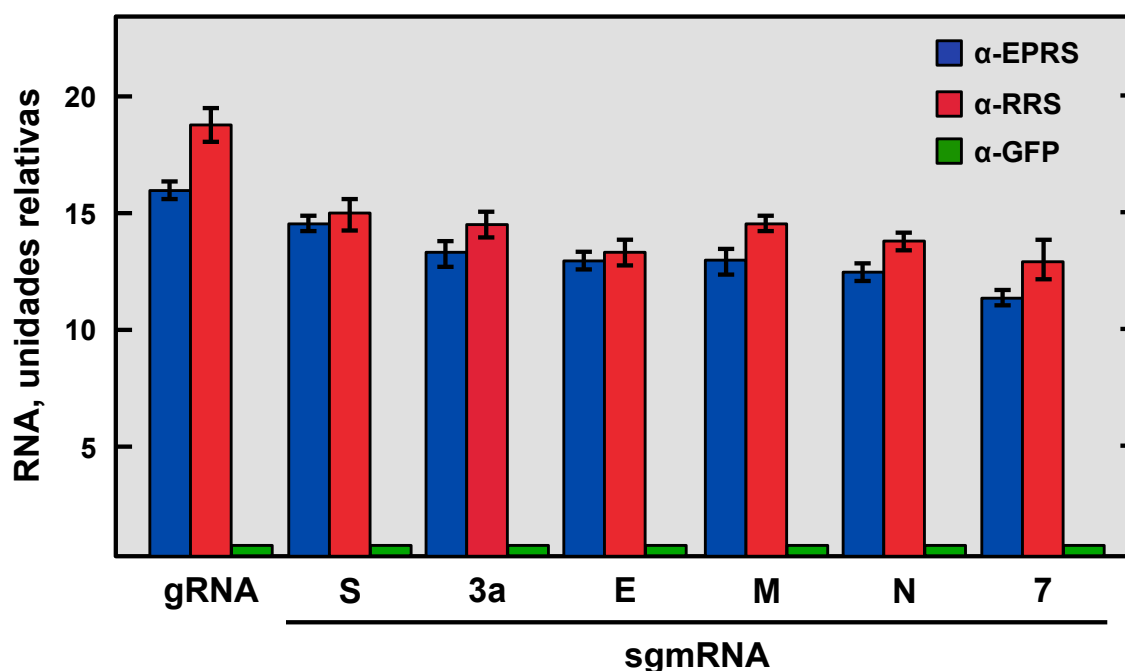


Figura 19. Análisis de la interacción de la EPRS y la RRS con los RNAs virales mediante inmunoprecipitación de RNA asociada a proteína. Extractos citoplasmáticos de células ST infectadas con el aislado PUR46-MAD del TGEV a una mdi de 5 UFP/célula se inmunoprecipitaron con anticuerpos específicos frente a las proteínas EPRS (α -EPRS), RRS (α -RRS) y GFP (α -GFP). La presencia del gRNA viral y de los sgRNA de los genes S, 3a, M, E, N y 7 en los complejos RNA-proteína inmunoprecipitados, se cuantificó mediante RT-qPCR y se expresó en relación a los niveles de RNA en las muestras inmunoprecipitadas con el anticuerpo control frente a GFP. Los datos representan la media de tres experimentos, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

3.3. Estudio de la incorporación de las aminoacil tRNA sintetasas EPRS y RRS en la partícula viral

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían mostrado la incorporación en las partículas virales del TGEV de varias proteínas virales y celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV (Nogales, 2012; Nogales y col., 2012). Teniendo en cuenta que las proteínas EPRS y RRS están implicadas en la síntesis de RNA de CoV y que ambas proteínas interaccionan específicamente con el gRNA, se analizó la posibilidad de que estas proteínas se incorporasen en la partícula viral a través de su interacción con el gRNA. Con este fin, extractos de células ST infectadas con el virus TGEV, o sin infectar, se separaron mediante SDS-PAGE junto con 10 μ g de viriones altamente purificados del TGEV y se analizaron por *Western blot* utilizando

anticuerpos específicos frente a las proteínas EPRS y RRS (Tabla IV). En paralelo, se analizó la presencia de la proteína estructural N como control positivo y del marcador de retículo endoplásmico GRP78 como control negativo, utilizando anticuerpos específicos (Tabla IV). Las dos aminoacil tRNA sintetasas se detectaron en los viriones purificados de forma similar a la proteína estructural N, mientras que la GRP78 se detectó en células no infectadas e infectadas pero no en viriones purificados (Fig. 20). Estos datos sugerían que las proteínas EPRS y RRS se incorporaban en la partícula viral.

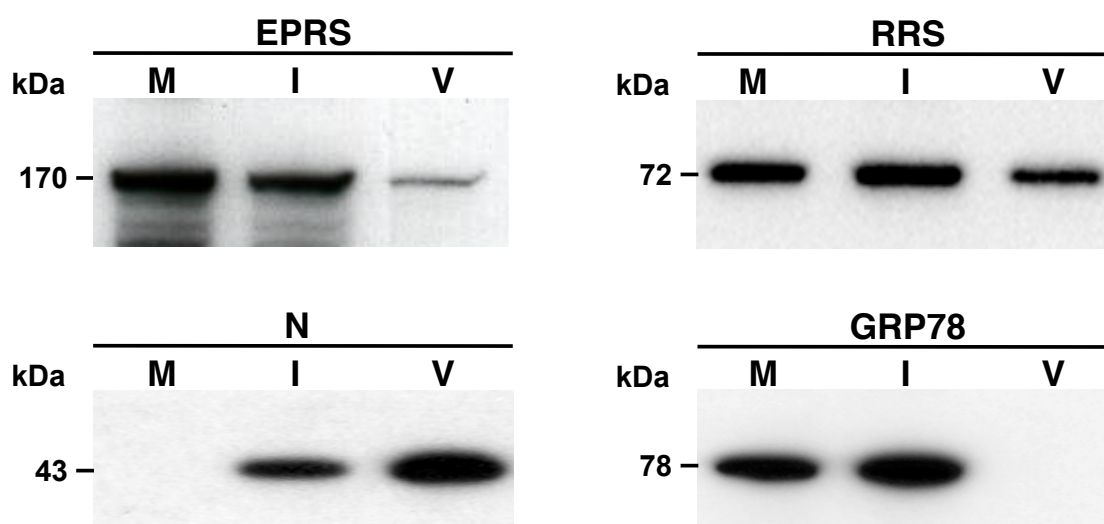


Figura 20. Identificación de las proteínas celulares EPRS y RRS en viriones purificados del TGEV. Extractos de células ST no infectadas (M) o infectadas (I) con el aislado PUR46-MAD del TGEV a una mdi de 5 UFP/célula se resolvieron mediante SDS-PAGE (NuPAGE 4-12% Bis-Tris) junto con 10 µg de viriones purificados (V) y se analizaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla IV) frente a las proteínas indicadas. Las masas moleculares de las proteínas analizadas se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

4. ANÁLISIS FUNCIONAL *IN VITRO* DEL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT DEL TGEV

En base al papel funcional del elemento GAIT celular en el silenciamiento de la traducción de mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias (Mukhopadhyay y col., 2009), se analizó si el motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV inhibía la traducción en presencia del complejo proteico GAIT. Con este fin, se construyeron tres mRNAs quiméricos que expresaban la proteína luciferasa y que contenían en su extremo 3' UTR el elemento GAIT de la Cp, el motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV o ningún elemento GAIT (Fig. 21A). Estos mRNAs se generaron mediante transcripción *in vitro* utilizando como molde los plásmidos pTNT-Luc-Cp, pTNT-Luc-TGEV y pTNT-Luc, respectivamente. Posteriormente, los mRNAs quiméricos se tradujeron *in vitro* usando lisados de reticulocitos en presencia o ausencia del complejo GAIT y la eficiencia de la traducción se analizó cuantificando la actividad de la luciferasa (Fig. 21B). Dado que el complejo GAIT se ensambla en células monocíticas tratadas con IFN- γ (Sampath y col., 2004), en las reacciones de traducción *in vitro* se utilizaron extractos citoplasmáticos de células monocíticas U937 tratadas con IFN- γ , como fuente del complejo GAIT. En ausencia del complejo GAIT se detectó traducción de la luciferasa en todos los casos (Fig. 21B), como era presumible. Sin embargo, en presencia del complejo GAIT se observó una clara inhibición de la traducción de aquellos mRNAs que contenían en su extremo 3' UTR el elemento GAIT de la Cp (75% de inhibición) o el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT (50% de inhibición) (Fig. 21B). Además, se observó una reversión de este efecto inhibitorio cuando a la reacción de traducción *in vitro* se añadieron cantidades crecientes del elemento GAIT de la Cp o del motivo de RNA viral como competidores, indicando que la inhibición de la traducción observada era debida específicamente a la presencia en el mRNA de los elementos GAIT celular o viral (datos no mostrados). En su conjunto, los datos obtenidos indicaron que el motivo de RNA viral inhibe la traducción de los mRNAs que lo contienen, posiblemente a través de su interacción con el complejo GAIT, de forma similar a lo descrito para el GAIT celular.

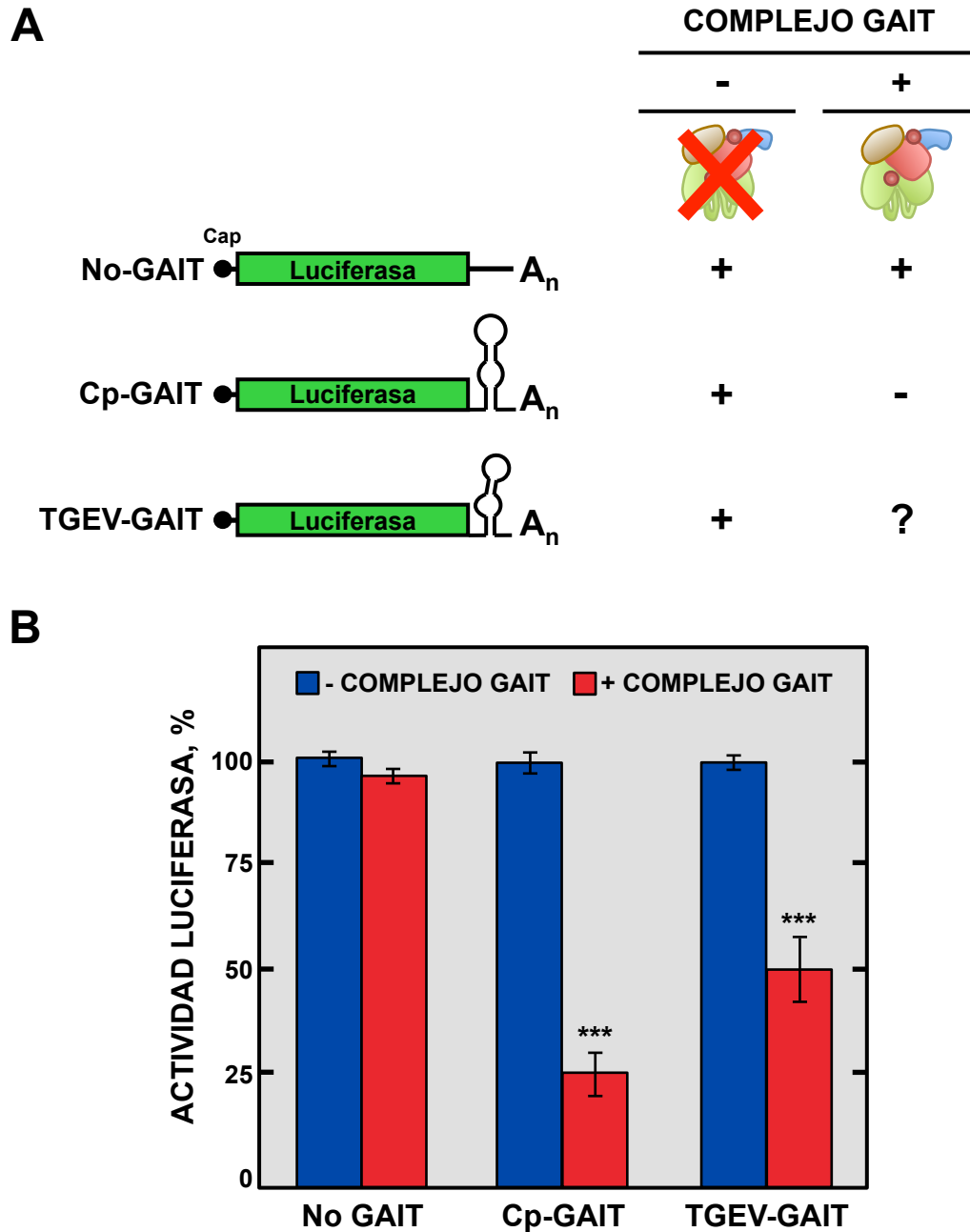


Figura 21. Análisis *in vitro* de la inhibición de la traducción mediada por el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT. (A) Diseño experimental. Se muestra la estructura genética de los mRNAs quiméricos que expresan la luciferasa, donde se indica si contienen en el 3' UTR ningún elemento GAIT (No-GAIT), el elemento GAIT de la Cp (Cp-GAIT) o el motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV (TGEV-GAIT). Además, se indican los resultados esperados de la traducción *in vitro* de estos mRNAs en ausencia (-) o en la presencia (+) del complejo GAIT. **(B) Análisis de la actividad luciferasa.** Los mRNAs quiméricos (No-GAIT, Cp-GAIT y TGEV-GAIT) se tradujeron *in vitro* en ausencia (barras azules) o en la presencia (barras rojas) del complejo GAIT. La eficiencia de la traducción se analizó cuantificando la actividad luciferasa mediante luminometría y se expresó como el porcentaje de actividad luciferasa obtenida en presencia del complejo GAIT con respecto a la actividad luciferasa obtenida en ausencia del complejo GAIT. Los datos representan la media de tres experimentos, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

5. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES DEL TGEV CON MUTACIONES EN EL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT

Una vez determinado que el motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV inhibe la traducción *in vitro* de los mRNAs que lo contienen, se estudió el papel funcional de este motivo en el contexto de la infección mediante análisis mutacional.

5.1. Diseño de mutantes del motivo de RNA similar al elemento GAIT y caracterización *in vitro* de su interacción con las proteínas EPRS y RRS

Basándonos en los datos funcionales del elemento GAIT de la Cp (Sampath y col., 2003; Mukhopadhyay y col., 2009) y teniendo en cuenta que el motivo de RNA viral se localiza dentro de la región codificante del gen 7, se diseñaron dos mutantes (mutC y mutG) que contuvieran mutaciones silenciosas y que, por homología con el elemento GAIT celular, afectaran a la interacción con las proteínas EPRS y RRS y por tanto a la funcionalidad del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT (Fig. 22A). El mutante mutC contenía una única mutación puntual U → C (posición genómica 28181) en el residuo conservado de uracilo localizado en el *loop* interno asimétrico, el cual es crítico para la funcionalidad del elemento GAIT de la Cp (Sampath y col., 2003; Mukhopadhyay y col., 2009) (Fig. 22A). El mutante mutG, contenía la mutación puntual U → C (posición genómica 28181) presente en el mutC y dos mutaciones puntuales adicionales, A → G y C → U (posiciones genómicas 28178 y 28190, respectivamente), las cuales rompían parcialmente el *stem* y el *loop* interno asimétrico que son también esenciales para la funcionalidad del elemento GAIT celular (Sampath y col., 2003; Mukhopadhyay y col., 2009) (Fig. 22A).

Los mutantes del dominio de RNA viral se sintetizaron químicamente y se analizó si las mutaciones introducidas afectaban a la interacción con las proteínas EPRS y RRS mediante cromatografía de afinidad a RNA y *Western blot*. Para ello, extractos citoplasmáticos de células Huh-7 infectados con el aislado PUR46-C11 del TGEV se incubaron con los motivos de RNA viral nativo o con los mutantes descritos, y la presencia de las proteínas EPRS y RRS en los complejos RNA-proteína aislados se analizó mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla IV). Se observó una reducción moderada en la interacción de ambas proteínas con el

mutante mutC con respecto al motivo nativo y una pérdida total de esta interacción en el caso del mutante mutG (Fig. 22B). Estos datos sugerían que las mutaciones introducidas afectaban total o parcialmente a la interacción de las proteínas EPRS y RRS con el motivo de RNA viral.

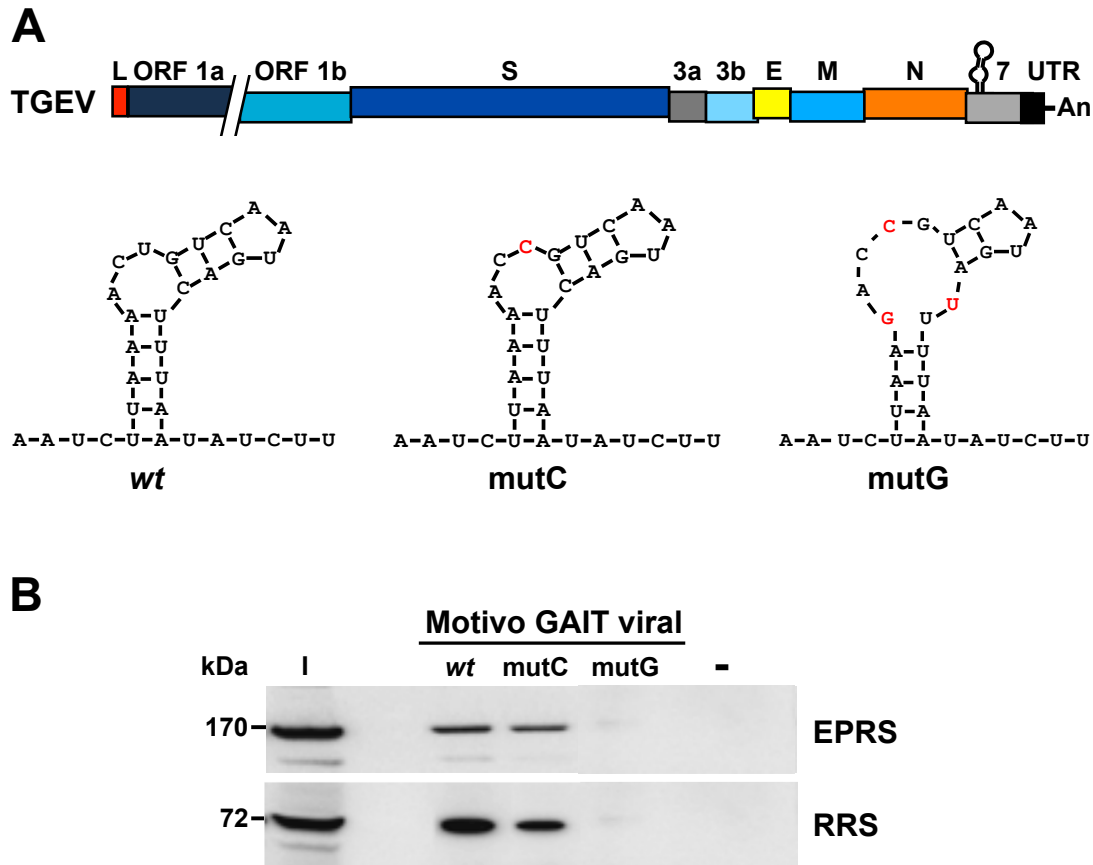


Figura 22. Diseño y caracterización *in vitro* de los mutantes del motivo de RNA similar al elemento GAIT. (A) Secuencia y estructura secundaria predicha de los mutantes del motivo de RNA viral. En la parte superior se muestra el genoma del TGEV, donde se indican los genes virales (ORF 1a, ORF 1b, S, 3a, 3b, E, M, N y 7), la secuencia líder (L), la secuencia 3' UTR (UTR), el poliA (An) y el motivo de RNA similar al elemento GAIT. En la parte inferior se muestran las secuencias y las predicciones de estructura secundaria del motivo de RNA similar al elemento GAIT nativo (*wt*) y de los mutantes mutC y mutG, donde las mutaciones introducidas se indican en rojo. **(B)** Análisis de la interacción de las proteínas EPRS y RRS con los mutantes del motivo de RNA viral. La interacción se analizó mediante cromatografías de afinidad a RNA utilizando 600 µg de extractos citoplasmáticos de células Huh-7 infectadas y RNAs biotinados correspondientes al motivo de RNA viral nativo (*wt*) o mutado (mutC y mutG). En paralelo, el ensayo también se realizó sin RNA (-) como control de especificidad. La presencia de la proteínas EPRS y la RRS en el extracto inicial (I) y en las proteínas aisladas por cromatografía de afinidad se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos específicos. Las masas moleculares de las proteínas analizadas se indican en kDa a la izquierda de cada panel.

5.2. Construcción de los virus recombinantes rTGEV-mutC y rTGEV-mutG

Una vez caracterizada la interacción *in vitro* de las proteínas EPRR y RRS con los mutantes del motivo de RNA viral, se generaron dos virus recombinantes con el motivo de RNA viral mutado (rTGEV-mutC y rTGEV-mutG) mediante genética reversa utilizando el clon infectivo de TGEV (Almazán y col., 2000), con el fin de estudiar el papel funcional del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT en el contexto de la infección. Los virus recombinantes se rescataron eficientemente a partir de los respectivos clones infectivos y todas las mutaciones introducidas se detectaron en los virus recombinantes después de 20 pases en cultivos celulares, indicando que los virus recombinantes rTGEV-mutC y rTGEV-mutG eran estables en cultivos celulares.

5.3. Caracterización de los virus rTGEV-mutC y rTGEV-mutG en cultivos celulares

Para determinar si las mutaciones introducidas afectaban a la replicación del virus en cultivos celulares, inicialmente se analizó el tamaño de placa y la cinética de crecimiento de los virus recombinantes rTGEV-mutC y rTGEV-mutG en comparación con el virus parental. El tamaño y la morfología de las placas de lisis se analizó utilizando células ST, no observándose diferencias significativas entre los virus mutantes y el virus parental (Fig. 23). Así mismo, cuando las cinéticas de

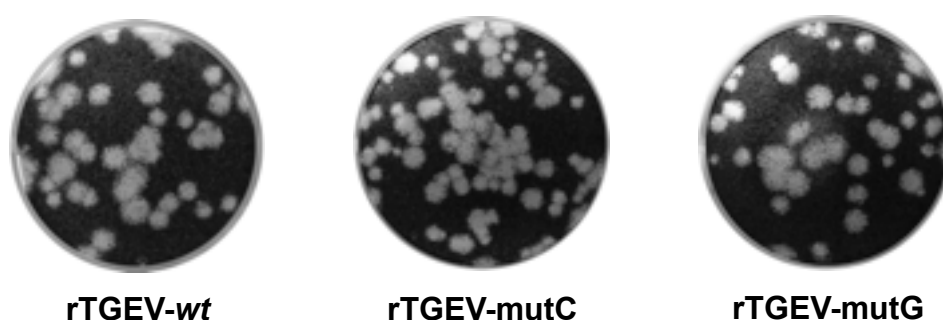


Figura 23. Morfología y tamaño de las placas de lisis producidas por los virus rTGEV-wt, rTGEV-mutC y rTGEV-mutG. Células ST se infectaron con los virus rTGEV-wt, rTGEV-mutC y rTGEV-mutG, se cubrieron con medio semisólido y las 48 hdi se fijaron con formaldehído y se tiñeron con cristal violeta.

crecimiento de los tres virus se analizaron en células ST infectadas a baja (0.05 UFP/célula) o a alta (3 UFP/célula) mdi, tampoco se observaron diferencias significativas en las cinéticas de crecimiento de los virus mutantes y el virus parental (Fig. 24).

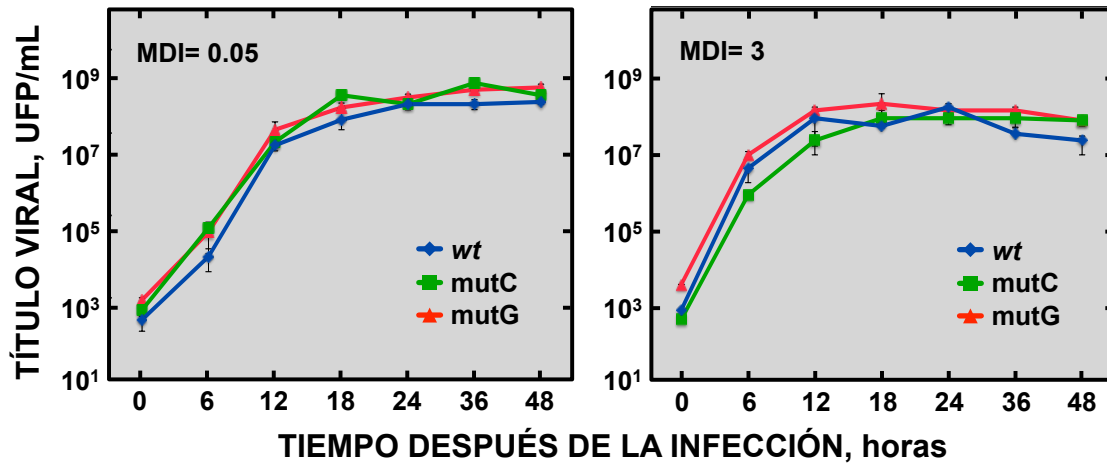


Figura 24. Cinética de crecimiento de los virus rTGEV-*wt*, rTGEV-*mutC* y rTGEV-*mutG*. Células ST se infectaron con los virus rTGEV-*wt* (azul), rTGEV-*mutC* (verde) y rTGEV-*mutG* (rojo) a una mdi de 0.05 o 3 UFP/célula, y a los tiempos indicados se determinó la producción viral mediante titulación en células ST. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

Finalmente, se analizó si las mutaciones introducidas en el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT afectaban a la síntesis de RNA viral. Para ello, células ST se infectaron con los virus rTGEV-*wt*, rTGEV-*mutC* y rTGEV-*mutG* a una mdi de 3 UFP/célula. A diferentes hdi se extrajo el RNA total y se cuantificaron los niveles del gRNA y del sgRNA del gen 7 mediante RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla II). Tanto los virus mutantes como el virus parental mostraron la misma cinética de acumulación del gRNA y del sgRNA7 (Fig. 25), indicando que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT no era esencial para la síntesis de RNA viral.

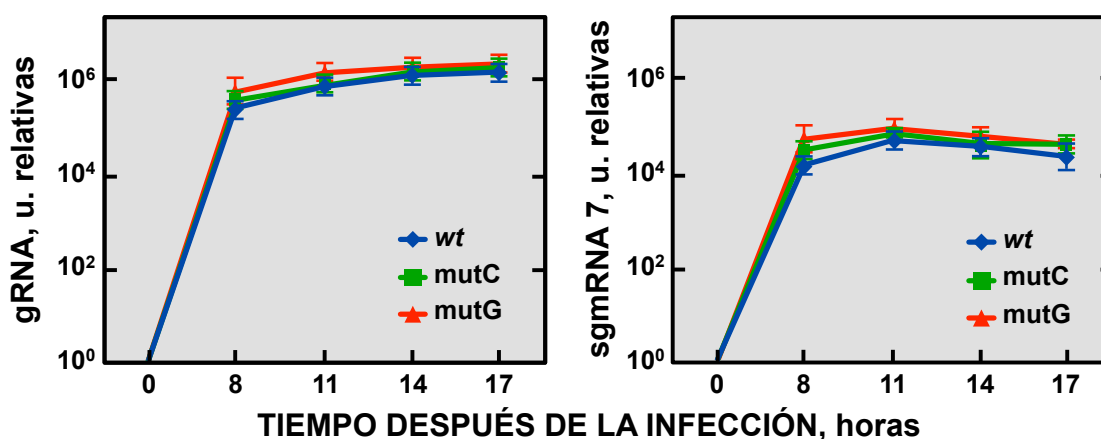


Figura 25. Análisis de la síntesis de RNA viral de los virus rTGEV-wt, rTGEV-mutC y rTGEV-mutG. Células ST se infectaron con los virus rTGEV-wt (azul), rTGEV-mutC (verde) y rTGEV-mutG (rojo), y a los tiempos indicadas se cuantificaron los niveles del gRNA y del sgRNA del gen 7 (sgmRNA7) mediante RT-qPCR. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

Los resultados obtenidos indicaron que el motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV era dispensable para la replicación del virus en cultivos celulares. Sin embargo, con este tipo de estudios no se puede descartar que el motivo de RNA viral pueda tener un pequeño efecto en la replicación del virus que no se detecte de forma significativa durante un único ciclo infectivo, pero que le confiera una ventaja selectiva al virus parental con respecto a los virus mutantes que pueda ser detectada a lo largo de varios ciclos de infección. Con el fin de analizar esta posibilidad, se realizaron ensayos de competición entre el virus rTGEV-wt y los virus mutantes rTGEV-mutG y rTGEV-mutC. Para ello, se coinfectaron células ST con el virus parental y cada uno de los virus mutantes en una proporción virus parental:virus mutante de 5:1, 1:1 y 1:5, y se dieron 20 pases seriados. En los pases 0, 5, 10, 15 y 20 se tomaron muestras de sobrenadante, se clonaron los virus y se secuenciaron 20 clones de cada pase para determinar la proporción de virus parental y mutante en cada caso. En todos los casos, la proporción entre virus parental y el mutante no varió significativamente y se mantuvo constante a lo largo de los pases (Fig. 26), indicando que el rTGEV-wt no presentaba ninguna ventaja selectiva respecto de los virus mutantes. Estos datos confirmaron que el motivo de RNA similar al elemento GAIT era dispensable para la replicación del virus en cultivos celulares.

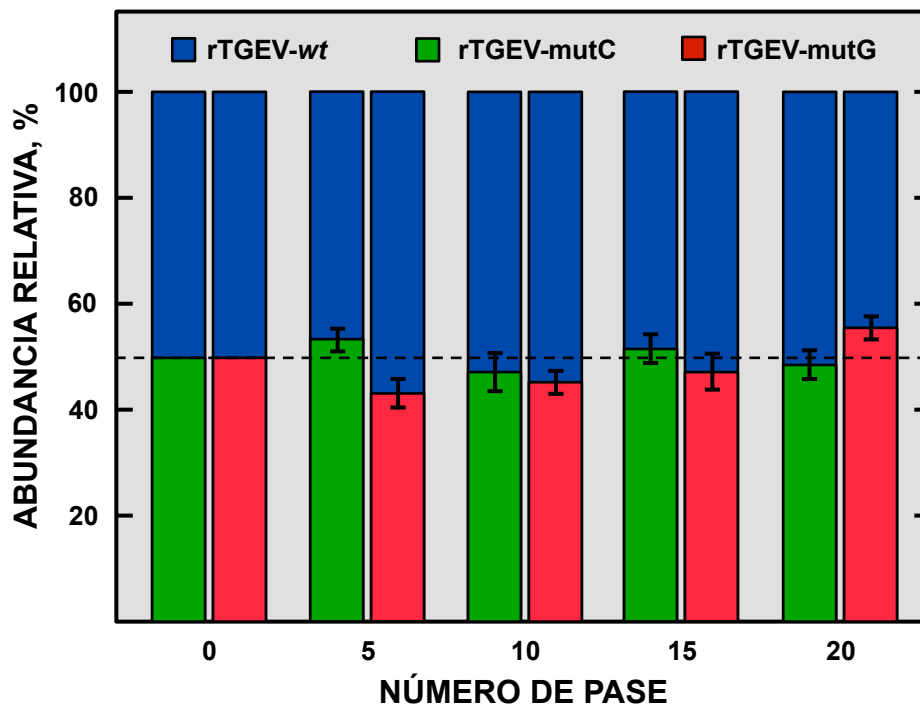


Figura 26. Ensayo de competición entre el virus parental y los virus mutantes. Células ST se coinfectaron con los virus rTGEV-wt (azul) y rTGEV-mutG (verde) o rTGEV-wt (azul) y rTGEV-mutC (rojo) en una proporción virus parental:virus mutante de 5:1, 1:1 y 1:5. A las 24 hdi se recogió la progenie viral y se utilizó para infectar nuevas células. Este procedimiento se repitió durante 20 pases seriados. A los pases indicados se determinó la proporción de cada virus mediante la secuenciación de 20 clones independientes de la progenie viral. No se detectaron diferencias significativas entre las tres proporciones analizadas, por lo que solo se muestra el resultado obtenido cuando la coinfección se realizó en la proporción virus parental:virus mutante de 1:1. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, indicándose con barras de error las desviaciones estándar.

6. RELEVANCIA DEL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INNATA INMUNE

El papel fisiológico del elemento GAIT celular es regular en el tiempo la respuesta inflamatoria para impedir su exacerbación y persistencia, mediante el silenciamiento de la traducción de diversos mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias. Teniendo en cuenta la implicación del elemento GAIT en la modulación de la respuesta inflamatoria y la dispensabilidad del motivo de RNA similar al elemento GAIT para la replicación viral en cultivos celulares, se exploró el posible papel del motivo de RNA viral en la modulación de la respuesta inflamatoria y más concretamente en la respuesta inmune innata del hospedador frente al virus TGEV.

Con esta finalidad, se infectaron células ST con los virus rTGEV-wt, rTGEV-mutC y rTGEV-mutG a una mdi de 3 UFP/célula y se analizó la cinética de expresión de un conjunto de citoquinas proinflamatorias (TNF, CCL2, CCL4, CXCL9 y CXCL11) mediante RT-qPCR utilizando ensayos TaqMan específicos para los genes porcinos (Tabla III). Las citoquinas analizadas se seleccionaron teniendo en cuenta datos previos del laboratorio que mostraban su implicación en la respuesta antiviral del huésped frente al TGEV (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013). Para descartar que los posibles cambios observados en el patrón de expresión de las citoquinas se debiera a un incremento general de la transcripción celular durante la infección, se evaluó la expresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que está implicado en la respuesta inmune del hospedador y su expresión no varía durante la infección del TGEV (Cruz y col., 2011; Cruz y col., 2013). Finalmente, también se evaluaron los niveles de gRNA y sgRNA 7 como controles de la síntesis de RNA viral. No se observaron cambios significativos en los niveles de gRNA, sgRNA 7 y TGF- β en células infectadas con los virus mutantes con respecto a los niveles detectados en células infectadas con el virus parental (Fig. 27, paneles superiores). Por el contrario, después de analizar la expresión de los genes proinflamatorios TNF, CCL2, CCL4, CXCL9 y CXCL11 durante la infección por los virus rTGEV-wt, rTGEV-mutC y rTGEV-mutG, además del incremento esperado en la expresión de todas estas citoquinas durante la infección con el virus parental con respecto a células no infectadas (Cruz y col., 2013), se observó que este incremento era significativamente superior en células infectadas con los dos mutantes (entre 2 y 20 veces con respecto a células infectadas con el virus parental), siendo éste incremento mayor en el caso de la infección con el mutante rTGEV-mutG (Fig. 27). Los resultados obtenidos indicaron que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT regulaba la respuesta inmune innata del hospedador.

En la respuesta inmune innata frente a patógenos virales están implicados, además de las citoquinas proinflamatorias, los IFNs de tipo I, entre los que destaca el IFN- β que controla la expresión de un gran grupo de moléculas efectoras de la respuesta antiviral, como son los de genes de respuesta a IFN o ISGs. Con el fin de analizar si el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT afectaba también la expresión de estas moléculas efectoras, se analizó la cinética de expresión del IFN- β

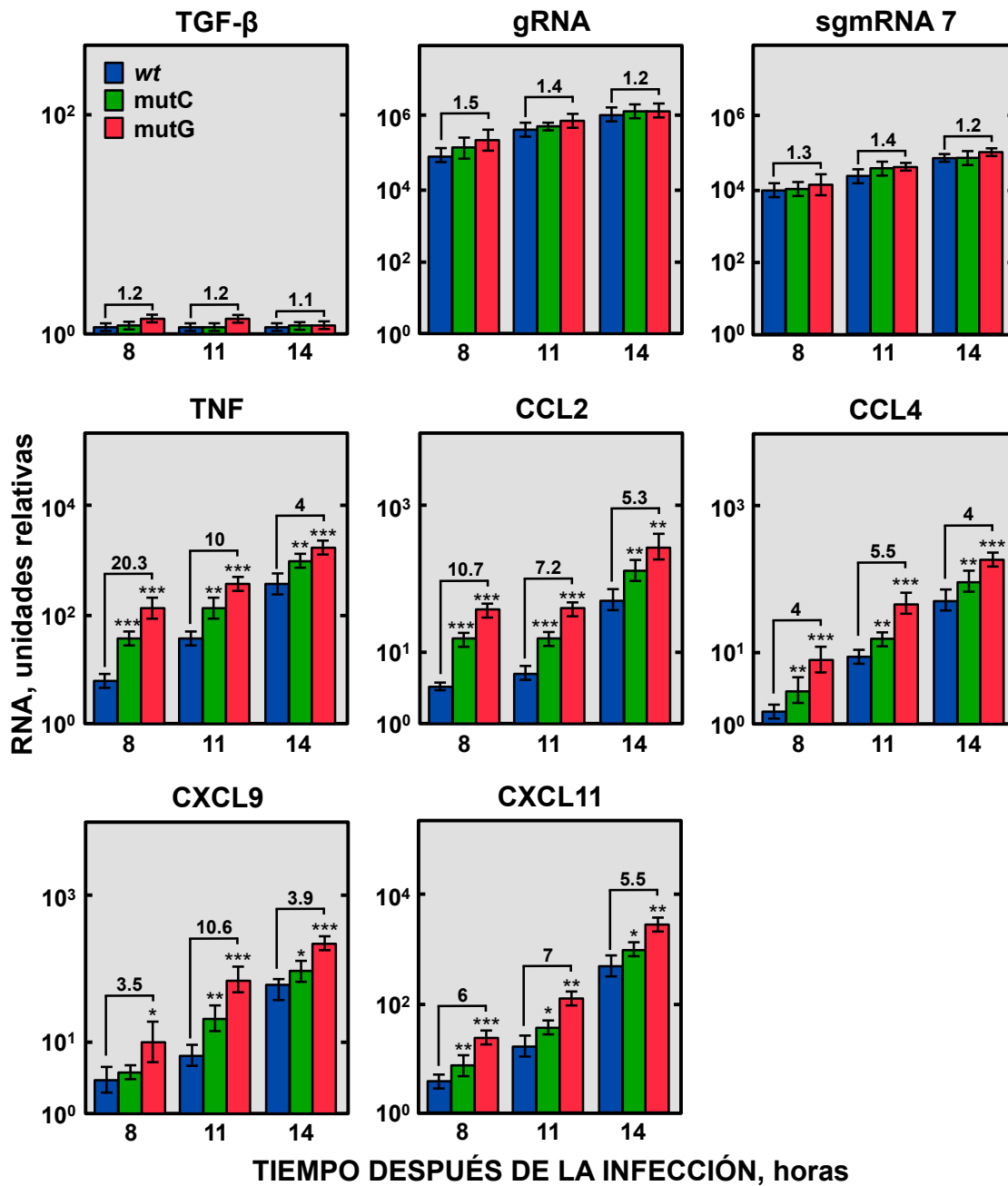


Figura 27. Cinética de expresión de citoquinas proinflamatorias durante la infección por TGEV.

Se infectaron células ST con los virus rTGEV-wt (azul), rTGEV-mutC (verde) y rTGEV-mutG (rojo) a una mdi de 3 UFP/célula, y a los tiempos indicados se cuantificaron los niveles de mRNA de la citoquinas proinflamatorias TNF, CCL2, CCL4, CXCL9 y CXCL11 mediante RT-qPCR. En paralelo, se cuantificaron los niveles de mRNA del TGF-β y de los RNAs virales gRNA y sgRNA 7 como controles del experimento. En todos los casos, los niveles de RNA cuantificados se normalizaron con los niveles de mRNA del gen de la GUS-β y se expresaron en relación a los niveles de RNA en células no infectadas. Se indica el número de veces del incremento en los niveles de expresión de los RNAs analizados en células infectadas con el virus rTGEV-mutG con respecto a los niveles detectados en células infectadas con el virus rTGEV-wt. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, indicándose con barras de error las desviaciones estándar. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

y de las ISGs MDA5 y RIG-I en células ST infectadas con los virus rTGEV-wt, rTGEV-mutC y rTGEV-mutG. De forma similar a lo descrito para las citoquinas proinflamatorias, se observó un incremento de entre 2 y 4 veces en los niveles de mRNA del IFN- β , MDA5 y RIG-I en células infectadas con los mutantes con respecto a las infectadas con el virus parental, siendo éste incremento mayor en el caso de la infección con el mutante rTGEV-mutG (Fig. 28). Por el contrario no se observaron cambios significativos en los niveles de los RNAs virales (gRNA y sgRNA 7) y del mRNA del TGF- β , confirmando que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT interfería con la respuesta inmune innata del hospedador.

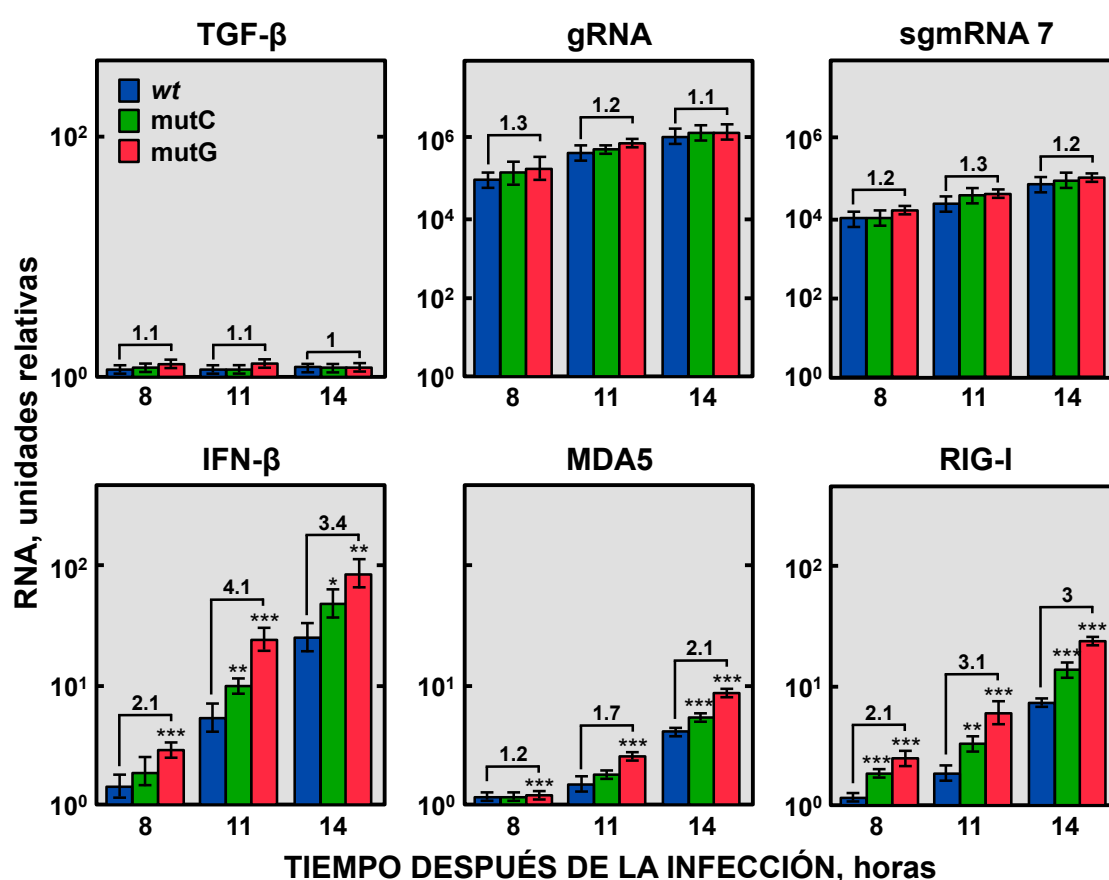


Figura 28. Cinética de expresión del IFN- β , MDA5 y RIG-I durante la infección por TGEV. La expresión de IFN- β , MDA5 y RIG-I en células ST infectadas con los virus rTGEV-wt (azul), rTGEV-mutC (verde) y rTGEV-mutG (rojo) a una mdi de 3 UFP/célula, se analizó a los tiempos indicados mediante RT-qPCR. Como controles del experimento, se cuantificaron los niveles de RNA viral (gRNA y sgRNA 7) y mRNA del TGF- β . En todos los casos, los niveles de RNA se normalizaron con los del mRNA del gen de la GUS- β y se expresaron en relación a los niveles de RNA en células no infectadas. Se indica el número de veces del incremento en los niveles de expresión de los RNAs analizados en células infectadas con el virus rTGEV-mutG con respecto a los niveles detectados en células infectadas con el virus rTGEV-wt. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, indicándose con barras de error las desviaciones estándar. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

7. ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA AFECTADA POR EL MOTIVO DE RNA VIRAL SIMILAR AL ELEMENTO GAIT

Una vez determinado que el motivo de RNA similar al elemento GAIT interfería con la respuesta inmune innata frente al TGEV, se profundizó en el estudio del mecanismo de acción del motivo de RNA viral. Para llevar a cabo estos estudios, se seleccionó el virus rTGEV-mutG entre los virus mutantes, dado que éste mostró un mayor efecto sobre la respuesta inmune innata.

La respuesta inmune innata inducida por dsRNA está mediada principalmente por cuatro familias de receptores celulares específicos o PRRs, los TLRs, la 2'-5'OAS, la PKR y los receptores de tipo gen I inducible por ácido retinoico (RLRs). Estos sensores celulares reconocen el dsRNA y desencadenan varias cascadas de señalización que conducen a la inhibición de la traducción, la producción de citoquinas proinflamatorias, la síntesis de IFN y en algunos casos la muerte celular (Jensen y Thomsen, 2012; Zinzula y Tramontano, 2013). De estos cuatro receptores, los TLRs apenas se expresan en fibroblastos (Ishii y col., 2008), como es el caso de las células ST, por lo que se analizó el efecto del motivo del RNA viral sobre las vías de señalización mediadas por la 2'-5'OAS, la PKR y los RLRs.

7.1. Efecto del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT sobre la vía de señalización mediada por la 2'-5'OAS

La 2'-5'OAS se activa por la unión de dsRNA, generando 2'-5' oligoadenilatos que activan a la RNasa L, la cual promueve la degradación de RNAs virales y celulares y por lo tanto la inhibición generalizada de la traducción (Hassel y col., 1993; Barral y col., 2009; Jensen y Thomsen, 2012). Con el fin de analizar el efecto del motivo de RNA viral sobre esta vía de señalización, se infectaron células ST con los virus rTGEV-wt y rTGEV-mutG y se analizó la degradación general de los RNAs virales y celulares a diferentes hdi usando un *Bioanalyzer*. Aunque en ambos casos se observó una ligera degradación del RNA a partir de las 12 hdi, no se detectaron diferencias significativas en la degradación del RNA inducida por el virus parental o el mutante (Fig. 29), indicando que el motivo de RNA viral no afectaba la vía de señalización mediada por la 2'-5'OAS.

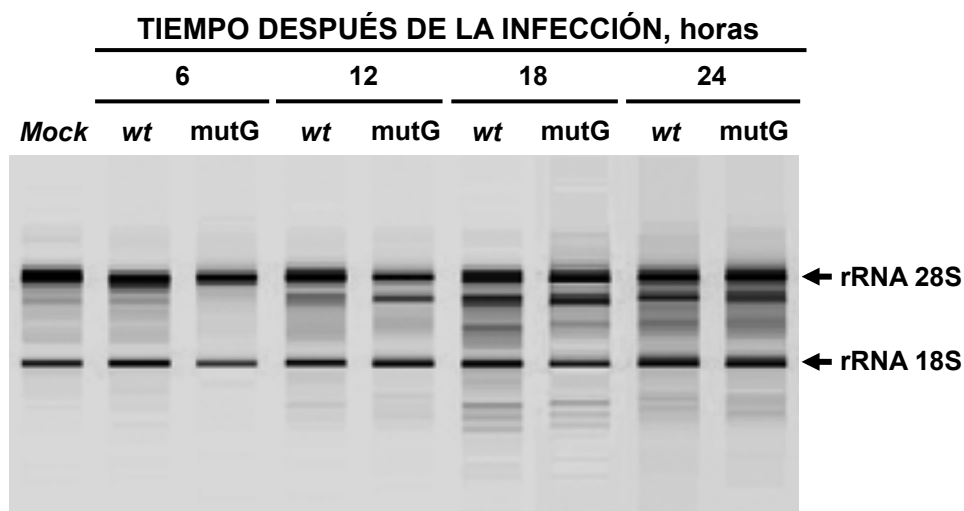


Figura 29. Análisis de la integridad del RNA durante la infección por TGEV. El RNA total extraído de células ST no infectadas (*Mock*) o infectadas a una mdi de 3 UFP/célula con los virus rTGEV-*wt* (*wt*) o rTGEV-*mutG* (*mutG*), se analizó a los tiempos indicados después de la infección utilizando un *Bioanalyzer*. Se indica la posición de los RNAs ribosómicos 28S y 18S (rRNA 28S y rRNA18S, respectivamente).

7.2. Efecto del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT sobre la vía de señalización mediada por la PKR

El reconocimiento del dsRNA por la PKR da lugar a su activación, a la fosforilación del factor de traducción eIF2 α y en consecuencia la inhibición general la síntesis de proteínas (Garcia y col., 2007; Nakayama y col., 2010). Así mismo, la PKR también promueve la activación de NF- κ B y p38 MAPK induciendo la expresión de IFNs de tipo I y citoquinas proinflamatorias (Mogensen, 2009). Con el fin de analizar el efecto del motivo de RNA viral sobre esta vía de señalización, se infectaron células ST con los virus rTGEV-*wt* y rTGEV-*mutG* y, se analizó la síntesis de proteínas *de novo* a diferentes hdi mediante marcaje metabólico utilizando una mezcla de metionina y cisteína marcadas radiactivamente con ^{35}S . No se observaron diferencias significativas en la síntesis de proteínas entre el virus parental y el mutante, y en ningún caso se observó una inhibición significativa de la traducción a los tiempos analizados (Fig. 30). Estos resultados indicaban que el motivo de RNA viral no afectaba la vía de señalización mediada por la PKR.

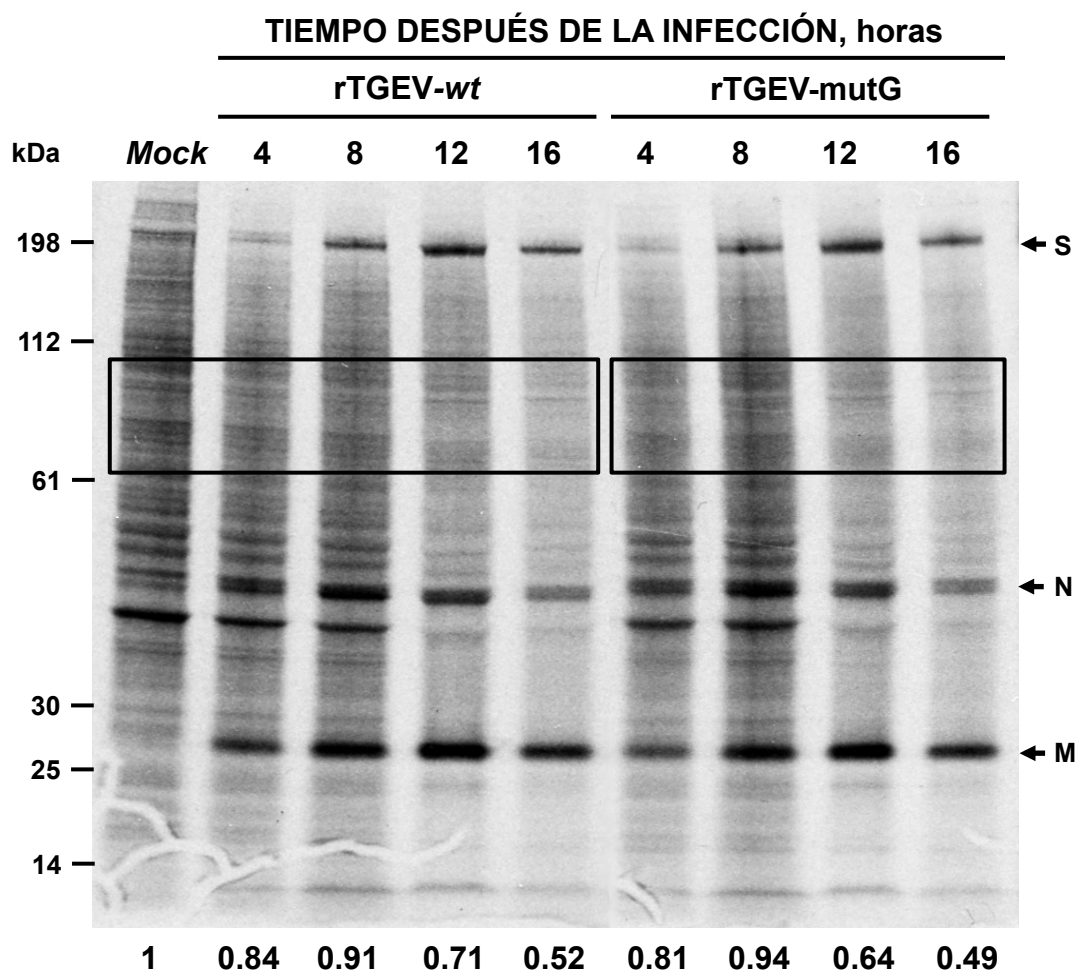


Figura 30. Análisis de la síntesis de proteínas durante la infección por TGEV. Células ST se infectaron a una mdi de 5 UFP/célula con los virus rTGEV-wt o rTGEV-mutG. A los tiempos indicados se dió un pulso de 2 h con una mezcla de metionina y cisteína marcadas radiactivamente con ^{35}S y las proteínas marcadas radiactivamente se analizaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y autorradiografía. La síntesis de proteínas se cuantificó mediante densitometría de la región recuadrada y se expresó en relación a los valores obtenidos en células sin infectar (Mock). A la izquierda del gel se indican los marcadores de masa molecular en kDa y a la izquierda del panel la posición de las proteínas estructurales del virus S, N y M.

7.3. Efecto del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT sobre la vía de señalización mediada por los RLRs

En células no inmunes la producción de citoquinas e IFN está principalmente mediada por los RLRs citoplasmáticos RIG-I y MDA5. Estos sensores citoplasmáticos reconocen dsRNAs y promueven la activación de los factores de transcripción IRF3/7 y NF- κ B, los cuales se translocan al núcleo y activan la expresión de citoquinas proinflamatorias e IFNs de tipo I (Jensen y Thomsen, 2012; Zinzula y Tramontano,

2013). En CoVs, se ha descrito que el RNA viral es reconocido principalmente por MDA5, aunque también se ha propuesto un papel para RIG-I en determinados tipos celulares como los oligodendrocitos (Li y col., 2010). Con el fin de analizar el efecto del motivo de RNA viral sobre las vías de señalización mediadas por RIG-I y MDA5, se realizaron experimentos de silenciamiento génico utilizando siRNAs específicos para MDA5 y RIG-I (Tabla VII).

Inicialmente, se optimizó la transfección de los siRNAs y los tiempos óptimos para el silenciamiento de los genes de las proteínas RIG-I y MDA5. En el caso de RIG-I y del control negativo se utilizaron siRNAs previamente validados en células porcinas (Husser y col., 2011). Para silenciar MDA5 se evaluaron dos siRNAs, seleccionándose el que dio lugar a un mayor nivel de silenciamiento (Tabla VII). En las condiciones optimizadas, se necesitaron dos pasos de transfección reversa con 25 nM de siRNA para conseguir un silenciamiento significativo tanto a nivel de mRNA como de proteína.

Posteriormente se analizó el efecto del silenciamiento génico de las proteínas RIG-I y MDA5, en células infectadas con el virus parental o el mutante sobre los niveles del gRNA viral y de los mRNAs del TNF y IFN- β . Para ello, células ST se transfectaron dos veces con un intervalo de 48 h con 25 nM de cada siRNA específico, o de un siRNA irrelevante como control negativo. A las 24 h después de la segunda transfección, las células se infectaron con los virus rTGEV-*wt* y rTGEV-*mutG* a una mdi de 3 UFP/célula. Transcurridas 12 y 18 hdi (36 y 42 h después de la segunda transfección, respectivamente) se recogieron muestras de RNA y proteína total para evaluar el silenciamiento génico y su efecto en la síntesis del gRNA viral y en los niveles de mRNA del TNF e IFN- β (Fig. 31A).

El silenciamiento de RIG-I y MDA5 a nivel de mRNA se analizó a las 12 y 18 hdi (36 y 42 h después de la segunda transfección, respectivamente) mediante RT-qPCR utilizando ensayos TaqMan específicos para cada gen (Tabla III), observándose una reducción en los niveles de mRNA del 43% y 35%, respectivamente (Fig. 31B). Por otra parte, el silenciamiento a nivel de proteína se evaluó a las 18 hdi (42 h después de la segunda transfección) mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos (Tabla IV). En consonancia con los datos obtenidos a nivel de mRNA, se observó una

reducción de los niveles de proteína cercana al 50% en ambos casos (Fig. 31C). A pesar de que el silenciamiento alcanzado para ambos genes fue modesto, se ha descrito en células porcinas que silenciamientos similares eran suficientes para observar un efecto en la producción de citoquinas (Husser y col., 2011).

El efecto del silenciamiento de los genes diana, DDX58 y IFIH1, sobre la síntesis del gRNA viral se analizó a las 12 y 18 hdi (36 y 42 h después de la segunda transfección, respectivamente), cuantificando los niveles del gRNA de los virus rTGEV-wt y rTGEV-mutG mediante RT-qPCR utilizando un ensayo TaqMan específico (Tabla II). En las células en las que se había silenciado RIG-I no se observaron diferencias en los niveles del gRNA viral con respecto a los niveles detectados en células transfectadas con un siRNA irrelevante. Sin embargo, en las células en las que se había silenciado MDA5, se observó un incremento en los niveles del gRNA para ambos virus, siendo este muy superior en el caso del virus rTGEV-mutG (Fig. 31D, panel izquierdo). Finalmente, se analizaron los niveles de mRNA del IFN- β y del TNF mediante RT-qPCR utilizando ensayos Taqman específicos para dichos genes (Tabla III). En concordancia con los datos obtenidos previamente (Figs. 27 y 28), en células no silenciadas se observó una mayor inducción en la expresión de IFN- β y del TNF en células infectadas con el virus mutante que en células infectadas con el virus parental (Fig. 31D, paneles derechos). Por otra parte, cuando se silenció RIG-I, los niveles de citoquinas inducidos por el virus rTGEV-mutG seguían siendo significativamente mayores que los inducidos por virus parental, mientras que cuando se silenció MDA5 estas diferencias desaparecían (Fig. 31D, paneles derechos). En su conjunto, estos datos indicaban que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT afectaba a la vía de señalización de la respuesta inmune innata mediada por MDA5.

En base a los datos obtenidos de los ensayos de silenciamiento génico, sería de esperar que en un ensayo de sensibilidad a IFN se observará una mayor susceptibilidad del virus mutante que del virus parental al IFN. Con el fin de determinar si este postulado era correcto, células ST se trataron con IFN- β porcino durante 16 h para inducir la sobreexpresión de los sensores citoplasmáticos RIG-I y MDA5, o se dejaron sin tratar. Posteriormente, las células no tratadas y las tratadas se infectaron con los virus rTGEV-wt o rTGEV-mutG. A las 8 hdi de la infección se recogió

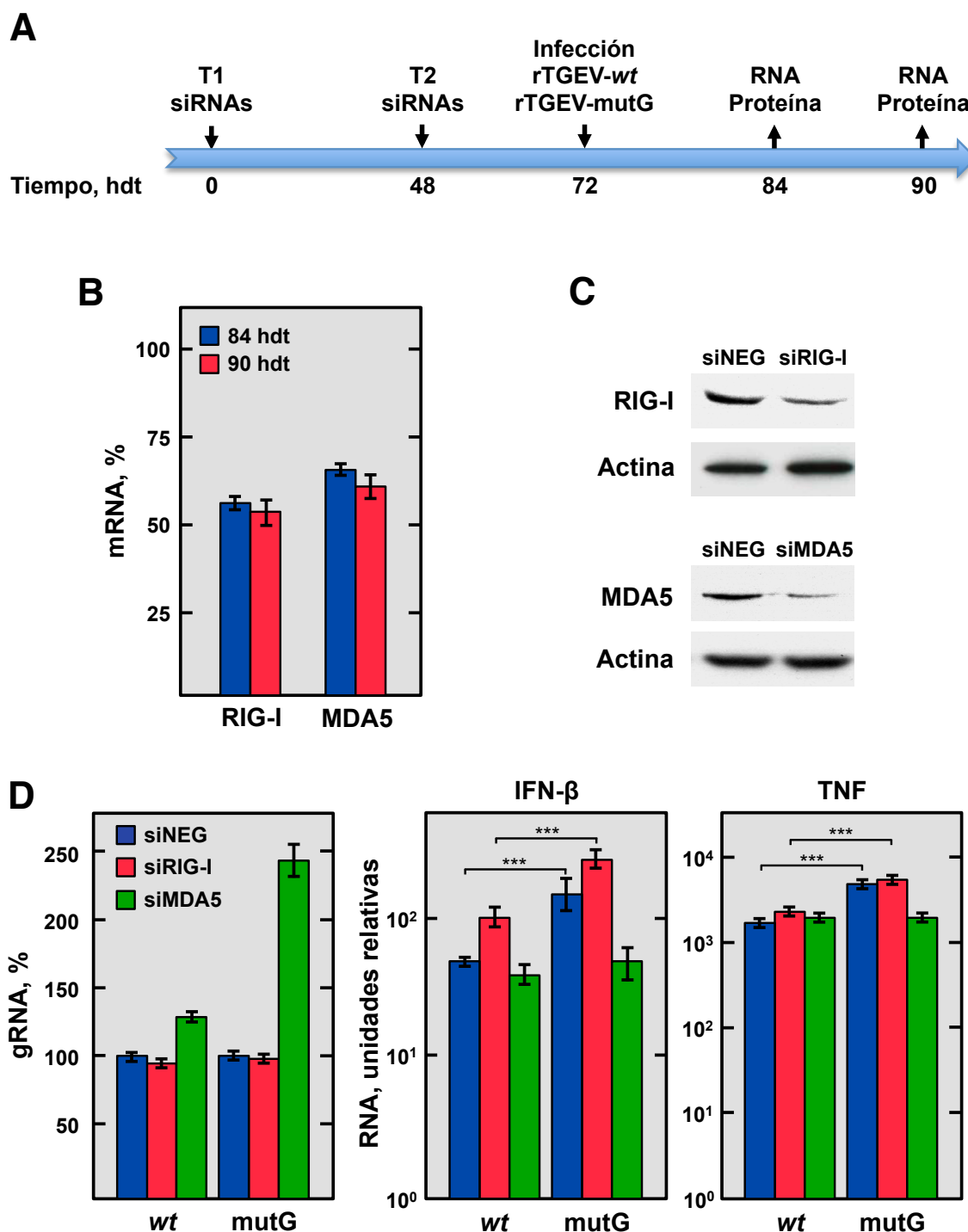


Figura 31. Efecto del silenciamiento de MDA5 y RIG-I en la producción de TNF e IFN- β durante las infecciones con rTGEV-wt y rTGEV-mutG. (A) Diseño experimental. Se muestra el esquema del procedimiento experimental, donde el tiempo hace referencia a las horas después de la primera transfección (hdt) con los siRNAs. Células ST se transfectaron (T1) con un siRNA irrelevante como control negativo y con los siRNAs específicos frente a RIG-I y MDA5 (Tabla VII). A los tiempos indicados, las células se retransfectaron con los mismos siRNAs (T2), se infectaron con los virus rTGEV-wt y rTGEV-mutG, y finalmente se tomaron muestras de proteína y RNA total para evaluar el silenciamiento génico, la producción viral y los niveles de mRNA del IFN- β y del TNF. (B) Análisis del silenciamiento

génico a nivel de mRNA. El porcentaje del mRNA después del silenciamiento de RIG-I y MDA5 se cuantificó a los tiempos indicados mediante RT-qPCR, en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante. **(C)** Análisis del silenciamiento génico a nivel de proteína. Los niveles de proteína después del silenciamiento de RIG-I y MDA5 se cuantificaron mediante *Western blot* a las 42 h después de la segunda transfección (18 hdi) con los siRNAs frente a RIG-I y MDA5 (siRIG-I y siMDA5, respectivamente) en comparación con los niveles de referencia en células transfectadas con un siRNA irrelevante (siNEG). Se determinaron los niveles de β -actina como control de carga. **(D)** Efecto del silenciamiento de RIG-I y MDA5 en la producción del gRNA viral, IFN- β y TNF. Los niveles del gRNA viral y de los mRNAs específicos del IFN- β y del TNF se cuantificaron mediante RT-qPCR en células infectadas con los virus rTGEV-wt (wt) o rTGEV-mutG (mutG), y transfectadas con un siRNA control (siNEG, azul) o siRNAs específicos para RIG-I (siRIG-I, rojo) y MDA5 (siMDA5, verde). Los niveles del gRNA viral se expresan como porcentaje con respecto a células no silenciadas e infectadas (panel izquierdo). Los niveles de mRNA del IFN- β y del TNF se expresan relativizados a los niveles observados en células no silenciadas y no infectadas. En todos los casos, los niveles de RNA cuantificados se normalizaron con los niveles de mRNA del gen de la GUS- β , el cual se usó como control interno. Los datos representan la media de tres experimentos, indicándose con barras de error las desviaciones estándar. ***, $P < 0.001$.

el RNA total para analizar los niveles de RIG-I, MDA5 y gRNA viral mediante RT-qPCR utilizando ensayos TaqMan específicos (Tablas II y III). Antes de analizar los niveles del gRNA viral, se cuantificaron los niveles de mRNA de RIG-I y MDA5, observándose que ambos sensores se habían sobreexpresado después del tratamiento con IFN- β , como se podría preveer (Fig. 32, panel izquierdo). Cuando se cuantificaron los niveles del gRNA para los virus parental y mutante, se observó una reducción significativa de los niveles de gRNA en células tratadas con IFN- β respecto a células no tratadas, siendo esta reducción significativamente mayor en el caso del virus mutante rTGEV-mutG (Fig. 32, panel derecho), confirmando que el virus mutante era más sensible a IFN que el virus parental.

En su conjunto, los datos obtenidos indicaban que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT interfería con la respuesta inmune innata afectando la vía de señalización mediada por el sensor citoplasmático MDA5.

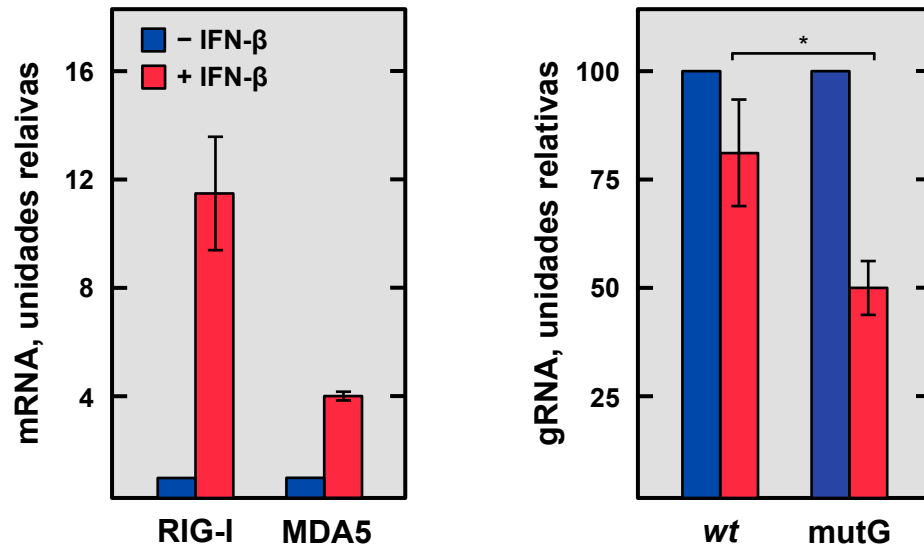


Figura 32. Sensibilidad a IFN- β de los virus rTGEV-*wt* y rTGEV-*mutG*. Células ST se trataron (rojo) o no (azul) con 4 ng/10⁶ células de IFN- β durante 16 h y posteriormente se infectaron con los virus rTGEV-*wt* (*wt*) y rTGEV-*mutG* (*mutG*) a una mdi de 3 UFP/célula. A las 8 hdi, se extrajo el RNA total, se cuantificaron los niveles del gRNA viral mediante RT-qPCR, y éstos se expresaron en relación con los obtenidos en células infectadas y no tratadas con IFN- β (panel derecho). Como control del tratamiento con IFN- β , se cuantificaron los niveles de mRNA de los sensores RIG-I y MDA5 (panel izquierdo). En todos los casos, los niveles de RNA cuantificados se normalizaron con los niveles de mRNA del gen de la GUS- β , el cual se usó como control interno. Los datos representan la media de tres experimentos, indicándose con barras de error las desviaciones estándar. *, $P < 0.05$.

VI. DISCUSIÓN

Los virus son parásitos intracelulares obligados que dependen del hospedador para completar la mayoría de las etapas de su ciclo infectivo donde intervienen un número considerable de proteínas celulares. Este fenómeno es especialmente importante en los virus RNA, dada su limitada capacidad codificante. Por lo tanto, la identificación y caracterización funcional de proteínas celulares implicadas en la replicación viral constituye actualmente una de las principales áreas de investigación en virología, con el fin de desarrollar nuevas estrategias antivirales para combatir las enfermedades virales. Esta tesis doctoral se ha centrado fundamentalmente en el estudio de proteínas celulares implicadas en la replicación de CoVs utilizando como modelo el virus TGEV. En este estudio se ha demostrado un papel funcional de las proteínas EPRS y RRS en la replicación del TGEV y se ha identificado y caracterizado el motivo de RNA del genoma viral que interacciona con ambas aminoacil tRNA sintetasas. Este motivo de RNA se localiza a 410 nt del extremo 3' del genoma, y presenta una elevada homología en secuencia y estructura secundaria con el elemento GAIT celular. De forma similar a lo descrito para el elemento GAIT, este motivo de RNA viral inhibe la traducción *in vitro* de un mRNA quimérico cuando este motivo está presente en su extremo 3' UTR, indicando que el motivo de RNA viral se comporta como el elemento GAIT celular *in vitro*. Finalmente, una aportación novedosa de esta tesis es que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT interfiere con la respuesta inmune innata del hospedador afectando la vía de señalización mediada por el sensor citoplasmático MDA5.

1. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CELULARES IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DE CoV

En la replicación de CoV presumiblemente intervienen proteínas celulares, análogamente a lo que se ha descrito para otros virus RNA de cadena positiva. En CoV, la identificación de proteínas celulares implicadas en replicación se ha realizado fundamentalmente en base a su interacción con los extremos del genoma, los cuales contienen las señales en *cis* necesarias para la replicación del genoma viral. En este sentido, recientemente en nuestro laboratorio se han identificado nueve proteínas celulares que interaccionan específicamente con el extremo 3' del genoma viral, entre las que se incluyen varias hnRNPs (A1, A0, A2B1, Q y U), los factores de

traducción PABP, EPRS y RRS, y el coactivador transcripcional p100 (Galan y col., 2009). La relevancia funcional de estas proteínas se analizó mediante silenciamiento génico, determinándose que las proteínas hnRNP Q, EPRS y PABP juegan un papel positivo en la síntesis de RNA de CoV y en la producción viral (Galan y col., 2009). En esta tesis doctoral, estos estudios funcionales se han ampliado a las proteínas RRS y p100. Estos estudios mostraron que el silenciamiento de la expresión de estas proteínas causaba una reducción de entre 2 y 3 veces en la síntesis de RNA y en la producción viral, indicando que al igual que las proteínas hnRNP Q, EPRS y PABP, la RRS y la p100 tenían un papel positivo en la infección por TGEV, posiblemente mediado por su interacción con el extremo 3' del genoma. Aunque el efecto observado en la síntesis del RNA viral y en los títulos virales fue moderado, estos resultados fueron muy similares cuantitativamente a los obtenidos en otros sistemas virales (Hara y col., 2009; Pettit Kneller y col., 2009). Este es el primer estudio donde se describe la implicación de la RRS en el ciclo infectivo de un virus.

Teniendo en cuenta la función canónica en traducción de la RRS y otras aminoacil tRNA sintetasas como la EPRS, se podría especular que la unión de la EPRS y la RRS al extremo 3' del genoma viral descrita en esta tesis podría constituir una estrategia para secuestrar enzimas importantes del proceso de traducción y de este modo competir con los mRNAs celulares por la maquinaria de traducción. Además de su función en la síntesis de proteínas, las aminoacil tRNA sintetasas de vertebrados han adquirido durante la evolución una variedad de funciones adicionales no canónicas relacionadas con procesos de señalización, respuesta a estrés y regulación transcripcional, entre otras (Ibba y Soll, 2000; Guo y Schimmel, 2013). En este sentido, los virus han reclutado este tipo de enzimas para llevar a cabo otras funciones esenciales no relacionadas con la síntesis de proteínas (Dewan y col., 2014). Así, se ha descrito que en algunos retrovirus las aminoacil tRNA sintetasas se encapsidan junto con sus correspondientes tRNAs para facilitar e iniciar el proceso de replicación (Cen y col., 2002), que en algunos virus de plantas catalizan la aminoacilación de dominios de RNA similares al tRNA en el extremo 3' del genoma con el fin de regular la replicación viral (Dreher, 2009), y que algunos virus DNA de gran tamaño las codifican en su genoma (Abergel y col., 2007). En este sentido la EPRS y la RRS

podrían estar implicadas en diferentes procesos esenciales del ciclo infectivo de CoV, como traducción, replicación y transcripción.

2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MOTIVO DE RNA QUE INTERACCIONA CON LAS PROTEÍNAS CELULARES EPRS Y RRS

Con el fin de obtener información acerca del mecanismo de acción de las proteínas celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV, se procedió a analizar los dominios de RNA del extremo 3' del genoma viral que interaccionaban con estas proteínas. Como consecuencia de estos estudios se identificó una secuencia de 32 nt, localizada a 410 nt del extremo 3' del genoma, que interaccionaba específicamente con las aminoacil tRNA sintetasas EPRS y RRS. La caracterización *in vitro* de esta interacción mostró que ésta era directa y que ambas proteínas interaccionaban durante la infección con el gRNA y los sgRNAs, como cabría esperar por la presencia de esta secuencia de RNA en todos los RNAs virales. Por otra parte, se observó que ambas proteínas se incorporaban en la partícula viral, posiblemente por su interacción con el gRNA viral, si bien se desconoce el papel funcional de este fenómeno. Recientemente, se ha descrito que otras proteínas virales y celulares implicadas en la síntesis de RNA de CoV se incorporan en la partícula viral (Nogales, 2012; Nogales y col., 2012), al igual que la EPRS y la RRS. Teniendo en cuenta la implicación de estas proteínas en la síntesis de RNA de CoV, se ha propuesto que estas proteínas virales y celulares encapsidadas podrían formar parte de un CRT encargado de llevar a cabo al inicio de la infección una primera amplificación del genoma viral antes de su traducción y de este modo asegurar la infección al disponer de varias copias del genoma viral (Nogales, 2012; Nogales y col., 2012).

Una aportación novedosa de esta tesis, fue la observación de que el dominio de RNA que interaccionaba con las proteínas EPRS y RRS presentaba una alta homología en secuencia y estructura secundaria con el elemento GAIT celular que se localiza en el 3' UTR de diversos mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias (Mukhopadhyay y col., 2009). Los monocitos y macrófagos actúan como primera línea de defensa celular frente a la invasión de microorganismos y para ello sintetizan citoquinas y quimioquinas. Sin embargo, una producción excesiva de estos factores puede tener efectos nocivos en el hospedador, por lo que existen diversos

mecanismos dirigidos a regular la producción de estos factores y resolver los procesos inflamatorios. Uno de estos mecanismos de regulación de la inflamación es el sistema del GAIT, descrito inicialmente en monocitos y macrófagos (Mukhopadhyay y col., 2009). En este sistema, después del estímulo del IFN- γ se ensambla el complejo proteico GAIT (constituido por las proteínas EPRS, hnRNP Q, L13a y GAPDH), que a través de la EPRS se une al elemento GAIT presente en el 3' UTR de diversos mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias, inhibiendo la traducción de estos mRNAs sin afectar la traducción global de la célula (Mukhopadhyay y col., 2009; Mazumder y col., 2010; Gebauer y col., 2012). De forma similar a lo descrito para el elemento GAIT celular, en esta tesis se ha determinado que el motivo de RNA viral era capaz de unir el complejo GAIT e inhibir la traducción *in vitro* de un mRNA quimérico que contenía este motivo en su región 3' UTR. Estos datos indicaron que el motivo de RNA viral que interacciona con las proteínas EPRS y RRS es un motivo funcionalmente similar al elemento GAIT celular, constituyendo la primera evidencia de la existencia de un motivo de RNA similar al elemento GAIT en un virus RNA de polaridad positiva.

En base a los resultados obtenidos, se podría postular que la EPRS y/o la RRS podrían formar parte de un complejo proteico que regulase la traducción viral a través de su interacción directa con el dominio de RNA similar al elemento GAIT. Con el fin de analizar esta posibilidad, se generaron dos virus recombinantes con mutaciones en el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT que eliminaban parcial (rTGEV-mutC) o totalmente (rTGEV-mutG) la interacción con las dos aminoacil tRNA sintetasas, y se analizó el crecimiento en cultivos celulares de los virus recombinantes en comparación con el virus parental. No se observaron diferencias significativas entre los virus mutantes y el virus parental en cuanto al tamaño de placa, la cinética de crecimiento, la síntesis de RNA y la producción viral. Además, no se detectó ninguna ventaja selectiva del virus nativo con respecto a los mutantes en experimentos de competición. Estos resultados indicaban que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT era dispensable para el crecimiento del virus en cultivos celulares y, por consiguiente, que el motivo de RNA viral no afectaba significativamente a la traducción viral, sugiriendo que en el contexto de la infección el motivo de RNA viral estaría actuando de forma diferente a lo descrito para el

elemento GAIT celular. Sin embargo, el hecho de que el motivo de RNA viral sea dispensable para la replicación viral en cultivos celulares no descarta que este tenga una función relevante para la replicación del virus *in vivo*. Esta posibilidad se está analizando actualmente en el laboratorio en el modelo porcino.

3. ESTUDIO DEL PAPEL DEL MOTIVO DE RNA SIMILAR AL ELEMENTO GAIT EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Una vez confirmada la dispensabilidad del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT para la replicación del virus en cultivos celulares, se analizó el posible papel de este motivo en la modulación de la respuesta inflamatoria y en la respuesta inmune innata. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa antiviral y su activación promueve la síntesis de citoquinas proinflamatorias e IFNs de tipo I para combatir las infecciones virales (Totura y Baric, 2012). En virus RNA, el dsRNA es el principal PAMP que desencadena la activación de un mecanismo antiviral que conduce a la inhibición de la traducción, la inducción transcripcional de genes antivirales, y a la muerte celular (Jensen y Thomsen, 2012; Zinzula y Tramontano, 2013). En el caso de CoVs, el dsRNA está presente a lo largo del genoma en regiones altamente estructuradas, o se puede generar como un intermediario de la replicación o transcripción del genoma viral (Brian y Baric, 2005; Sola y col., 2011b; 2008; Sawicki y col., 2001). En este trabajo se ha determinado que la infección con los virus recombinantes conteniendo el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT mutado estimulaba la expresión exacerbada de citoquinas proinflamatorias, IFN- β y de las ISGs RIG-I y MDA5, en comparación con la infección con el virus parental, indicando que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT interfería con la respuesta inmune innata. Entre los virus mutantes, el rTGEV-mutG indujo una respuesta mayor que el rTGEV-mutC. Esta diferencia se puede explicar por el número y la naturaleza de las mutaciones introducidas, que en el caso del rTGEV-mutG son más drásticas y afectan fuertemente tanto a la estructura del motivo de RNA viral como a la interacción con las proteínas EPRS y RRS. Los datos de inducción obtenidos fueron similares o incluso superiores a los descritos en otros estudios con CoV y otros virus RNA (Zinzula y Tramontano, 2013). Sin embargo, a diferencia de otros virus RNA en los que se ha descrito que la presencia de dominios de RNA estructurados en sus

genomas inducen la respuesta inmune innata estimulada por dsRNA (Saito y col., 2008; Uzri y Gehrke, 2009; Rodríguez Pulido y Sáiz, 2013; Feng y col., 2014), los datos obtenidos en esta tesis indican que el motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV interfiere con la respuesta inmune innata inducida por la infección viral. Por otra parte, el estudio realizado en esta tesis adquiere una mayor relevancia, ya que este se ha llevado a cabo en el contexto de la infección, a diferencia de los estudios descritos en otros virus, los cuales se han realizado mediante transfecciones de RNAs purificados.

A continuación, se analizó la vía de señalización de la respuesta inmune innata que se modulaba por el motivo de RNA similar al elemento GAIT. La respuesta inmune innata inducida por dsRNA está mediada principalmente por los TLRs, los sensores citoplasmáticos RIG-I y MDA5, y en menor medida por la 2'-5'OAS y la PKR. Después del reconocimiento del dsRNA, estos mediadores desencadenan varias cascadas de señalización que conducen principalmente a la inhibición de la traducción, la producción de citoquinas proinflamatorias y la síntesis de IFN (Jensen y Thomsen, 2012; Zinzula y Tramontano, 2013). De las cuatro vías de señalización, la mediada por los TLRs se descartó inicialmente teniendo en cuenta que estos receptores apenas se expresan en células de tipo fibroblasto como son las células ST donde se ha realizado el estudio. Al analizar las otras tres vías de señalización se comprobó que el motivo de RNA viral similar al elemento GAIT interfería con la respuesta inmune innata afectando la vía de señalización mediada por el sensor citoplasmático MDA5. Los resultados obtenidos en esta tesis están en consonancia con estudios realizados en otros CoVs como MHV, HCoV-229E y SARS-CoV, donde se describe que la respuesta antiviral frente al RNA viral está mediada principalmente por MDA5 (Zust y col., 2011; Menachery y col., 2014). Sin embargo, esta es la primera vez que se identifica un motivo de RNA concreto como responsable de tal efecto.

En cuanto al mecanismo de acción del motivo de RNA similar al elemento GAIT, se podría postular que este motivo de RNA podría actuar directamente sobre MDA5, previniendo su activación y posterior señalización. En este sentido, las mutaciones introducidas en el motivo de RNA viral que afectan la estructura secundaria del mismo podrían afectar a la posible interacción del motivo de RNA viral con MDA5 y, de este modo, permitir la activación de MDA5 mediada por el motivo de RNA viral

mutado u otro dsRNA. Esta hipótesis estaría en línea con el mecanismo descrito recientemente en adenovirus para contrarrestar la respuesta inmune innata. Los adenovirus transcriben un RNA no codificante, denominado VAI, que presenta una estructura secundaria con forma de horquilla muy conservada entre los distintos serotipos. Esta estructura interacciona con la PKR evitando su dimerización y en consecuencia su activación (Carnero y col., 2011; Launer-Felty y Cole, 2014).

Alternativamente, la interacción con las proteínas EPRS y RRS podría enmascarar el motivo de RNA viral, haciéndolo inaccesible a los sensores celulares de dsRNA, como MDA5, y de este modo evitar la activación de la respuesta inmune innata. En este sentido, las mutaciones introducidas en el motivo de RNA similar al elemento GAIT que conllevan la pérdida de la interacción con las proteínas EPRS y RRS, permitirían que el motivo de RNA fuese detectado por MDA5 induciendo una respuesta antiviral mas fuerte y rápida, como la observada durante la infección con el virus rTGEV-mutG. En línea con esta hipótesis, la incorporación en la partícula viral de las proteínas EPRS y RRS observada en este trabajo, permitiría mantener oculto el dominio de RNA similar al elemento GAIT al inicio de la infección y de este modo evitar su reconocimiento durante el proceso de entrada y desensamblaje de la partícula viral. Hasta la fecha, esta sería la primera vez que se propone que una proteína celular enmascararía un dominio de RNA viral para evadir la respuesta antiviral. Se han descrito mecanismos de acción similares en virus RNA de polaridad negativa como el virus de la gripe o el del ébola. Sin embargo, en ambos casos se trata de una proteína viral en lugar de una proteína celular la que interacciona con un motivo de dsRNA presente en el genoma viral impidiendo el reconocimiento de estos motivos de dsRNA por los sensores celulares de la respuesta inmune innata (Zinzula y Tramontano, 2013).

La identificación del motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV y su función en la modulación de la respuesta inmune innata puede ser de gran relevancia para otros CoVs humanos altamente virulentos como el SARS-CoV y MERS-CoV. De hecho, se han identificado posibles motivos de RNA similares al elemento GAIT en la región 3' UTR del genoma del SARS-CoV y del MERS-CoV mediante análisis bioinformáticos basados tanto en la secuencia como en la estructura del elemento GAIT celular (Fig 33). La homología a nivel de secuencia de estos motivos con el GAIT

de la Cp no es tan elevada como la descrita para el motivo de RNA viral del TGEV, sin embargo, todos ellos presentan una estructura secundaria similar (Fig. 33), sugiriendo que la presencia de un motivo de RNA similar al elemento GAIT en el genoma viral pueda ser una característica común de todos los CoVs.

Actualmente, se está analizando el papel del motivo de RNA viral similar al elemento GAIT en patogénesis y si los motivos de RNA candidatos del SARS-CoV y del MERS-CoV tienen la misma función que el homólogo del TGEV.

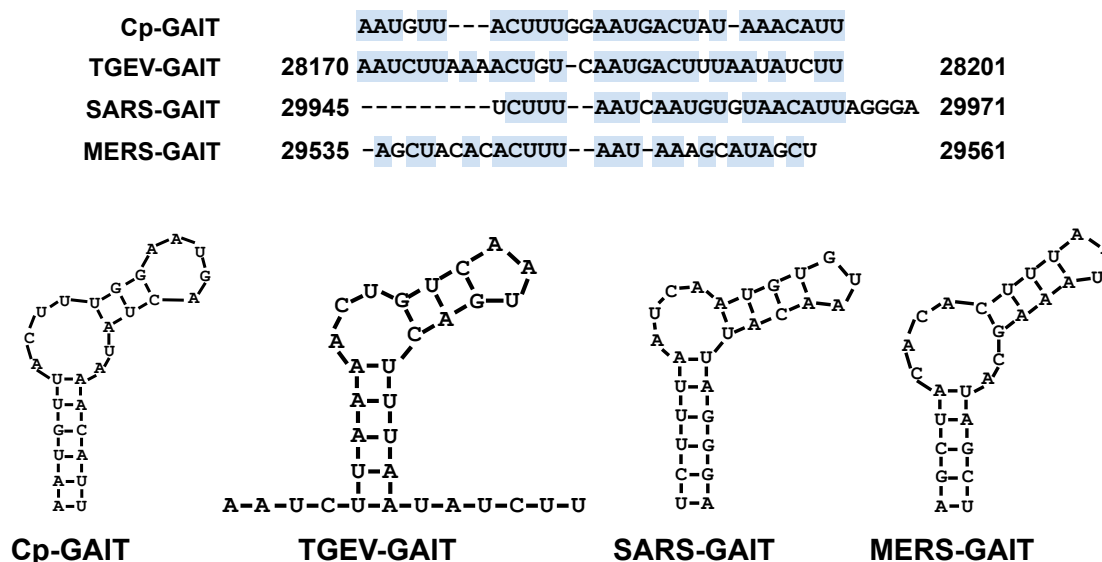


Figura 33. Conservación del motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV en otros CoVs. En la parte superior de la figura se muestra el alineamiento de las secuencias del elemento GAIT de la Cp (Cp-GAIT), del motivo de RNA similar al elemento GAIT del TGEV (TGEV-GAIT) y de los motivos predichos mediante análisis bioinformático del SARS-CoV (SARS-GAIT) y del MERS-CoV (MERS-GAIT). A ambos lados de la secuencia se indica la posición genómica de los motivos de RNA virales. Los nucleótidos conservados en al menos dos secuencias se indican con cajas azules. En la parte inferior de la figura se muestra la estructura secundaria predicha para los cuatro motivos de RNA.

1. Se ha demostrado que las proteínas p100 y RRS tienen un papel positivo en la síntesis del RNA viral y en la producción viral de forma similar a las proteínas hnRNP Q, EPRS y PABP.
2. La interacción de la proteína PABP con el extremo 3' del genoma viral está mediada por la cola de poliA, mientras que la interacción de las proteínas EPRS, RRS, p100 y las hnRNPs A0, A1, Q y U es independiente de la cola de poliA.
3. Se ha identificado el motivo de RNA del extremo 3' del genoma viral que interacciona con las aminoacil tRNA sintetasas EPRS y RRS. Este motivo consiste en una secuencia de RNA de 32 nt localizada a 410 nt del extremo 3' del genoma que está presente tanto en el gRNA como en los sgRNAs virales. Se ha demostrado que esta interacción se da *in vitro* y en el contexto de la infección mediante ensayos de cromatografía de afinidad a RNA e inmunoprecipitación de RNA asociado a proteínas, respectivamente.
4. Las proteínas EPRS y RRS se incorporan en la partícula viral, posiblemente a través de su interacción con el gRNA viral.
5. El motivo de RNA que interacciona con las aminoacil tRNA sintetasas presenta una alta homología en secuencia y estructura secundaria con el elemento GAIT celular que se localiza en el 3' UTR de diversos mRNAs que codifican proteínas proinflamatorias. Este motivo de RNA viral es funcionalmente análogo al GAIT celular dado que en presencia del complejo GAIT inhibe la traducción *in vitro* de mRNAs que contienen este motivo en su región 3' UTR.
6. El motivo de RNA viral similar al elemento GAIT no es esencial para la replicación del TGEV en cultivos celulares.
7. El motivo de RNA viral interfiere con la respuesta inmune innata afectando la vía de señalización mediada por el sensor citoplasmático MDA5.

- 8.** Se han identificado motivos de RNA similares al elemento GAIT en la región 3' UTR del SARS-CoV y del MERS-CoV mediante análisis bioinformáticos, sugiriendo que la presencia de este motivo de RNA viral puede ser una característica común a todos los CoV.

- Abergel, C., Rudinger-Thirion, J., Giege, R., Claverie, J.M.,** 2007. Virus-encoded aminoacyl-tRNA synthetases: structural and functional characterization of mimivirus TyrRS and MetRS. *J. Virol.* **81**, 12406-12417.
- Adedeji, A.O., Marchand, B., Te Velhuis, A.J., Snijder, E.J., Weiss, S., Eoff, R.L., Singh, K., Sarafianos, S.G.,** 2012. Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase. *PLoS One* **7**, e36521.
- Ahn, D.G., Choi, J.K., Taylor, D.R., Oh, J.W.,** 2012. Biochemical characterization of a recombinant SARS coronavirus nsp12 RNA-dependent RNA polymerase capable of copying viral RNA templates. *Arch. Virol.* **157**, 2095-2104.
- Almazán, F., Dediego, M.L., Galán, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zúñiga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L.,** 2006. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* **80**, 10900-10906.
- Almazán, F., Galán, C., Enjuanes, L.,** 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**, 12683-12688.
- Almazán, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.,** 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5516-5521.
- Almazán, F., Sola, I., Zúñiga, S., Márquez-Jurado, S., Morales, L., Bécares, M., Enjuanes, L.,** 2014. Coronavirus reverse genetic systems: infectious clones and replicons. *Virus Res.* **189**, 262-270.
- Annan, A., Baldwin, H.J., Corman, V.M., Klose, S.M., Owusu, M., Nkrumah, E.E., Badu, E.K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y.A., Kalko, E.K., Lina, P.H., Godlevska, E.V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J.F.,** 2013. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 456-459.
- Baric, R.S., Yount, B.,** 2000. Subgenomic negative-strand RNA function during mouse hepatitis virus infection. *J. Virol.* **74**, 4039-4046.
- Barral, P.M., Sarkar, D., Su, Z.Z., Barber, G.N., DeSalle, R., Racaniello, V.R., Fisher, P.B.,** 2009. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol. Ther.* **124**, 219-234.
- Bermingham, A., Chand, M.A., Brown, C.S., Aarons, E., Tong, C., Langrish, C., Hoschler, K., Brown, K., Galiano, M., Myers, R., Pebody, R.G., Green, H.K., Boddington, N.L., Gopal, R., Price, N., Newsholme, W., Drosten, C., Fouchier, R.A., Zambon, M.,** 2012. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro. Surveill.* **17**, 20290.
- Bouvet, M., Debarnot, C., Imbert, I., Selisko, B., Snijder, E.J., Canard, B., Decroly, E.,** 2010. In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog.* **6**, e1000863.
- Bouvet, M., Imbert, I., Subissi, L., Gluais, L., Canard, B., Decroly, E.,** 2012. RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus

nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **109**, 9372-9377.

Brian, D.A., Baric, R.S., 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 1-30.

Brierley, I., Digard, P., Inglis, S.C., 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**, 537-547.

Brockway, S.M., Clay, C.T., Lu, X.T., Denison, M.R., 2003. Characterization of the expression, intracellular localization, and replication complex association of the putative mouse hepatitis virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* **77**, 10515-10527.

Brown, C.G., Nixon, K.S., Senanayake, S.D., Brian, D.A., 2007. An RNA stem-loop within the bovine coronavirus nsp1 coding region is a cis-acting element in defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **81**, 7716-7724.

Carnero, E., Sutherland, J.D., Fortes, P., 2011. Adenovirus and miRNAs. *Biochim. Biophys. Acta* **1809**, 660-667.

Carstens, E.B., 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch. Virol.* **155**, 133-146.

Cavanagh, D., 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* **34**, 439-448.

Cen, S., Javanbakht, H., Kim, S., Shiba, K., Craven, R., Rein, A., Ewalt, K., Schimmel, P., Musier-Forsyth, K., Kleiman, L., 2002. Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J. Virol.* **76**, 13111-13115.

Chang, R.Y., Hofmann, M.A., Sethna, P.B., Brian, D.A., 1994. A cis-acting function for the coronavirus leader in defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **68**, 8223-8231.

Chang, R.Y., Krishnan, R., Brian, D.A., 1996. The UCUAAC promoter motif is not required for high-frequency leader recombination in bovine coronavirus defective interfering RNA. *J. Virol.* **70**, 2720-2729.

Chen, S.C., Olsthoorn, R.C., 2010. Group-specific structural features of the 5'-proximal sequences of coronavirus genomic RNAs. *Virology* **401**, 29-41.

Chen, Y., Cai, H., Pan, J., Xiang, N., Tien, P., Ahola, T., Guo, D., 2009. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 3484-3489.

Cheng, A., Zhang, W., Xie, Y., Jiang, W., Arnold, E., Sarafianos, S.G., Ding, J., 2005. Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* **335**, 165-176.

Chiang, J.J., Davis, M.E., Gack, M.U., 2014. Regulation of RIG-I-like receptor signaling by host and viral proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 491-505.

Choi, K.S., Mizutani, A., Lai, M.M., 2004. SYNCRIP, a member of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family, is involved in mouse hepatitis virus RNA synthesis. *J. Virol.* **78**, 13153-13162.

- Correa, I., Jiménez, G., Sune, C., Bullido, M.J., Enjuanes, L.,** 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res.* **10**, 77-93.
- Cruz, J.L., Bécares, M., Sola, I., Oliveros, J.C., Enjuanes, L., Zúñiga, S.,** 2013. Alphacoronavirus protein 7 modulates host innate immune response. *J. Virol.* **87**, 9754-9767.
- Cruz, J.L., Sola, I., Bécares, M., Alberca, B., Plana, J., Enjuanes, L., Zúñiga, S.,** 2011. Coronavirus gene 7 counteracts host defenses and modulates virus virulence. *PLoS Pathog.* **7**, e1002090.
- Curtis, K.M., Yount, B., Sims, A.C., Baric, R.S.,** 2004. Reverse genetic analysis of the transcription regulatory sequence of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **78**, 6061-6066.
- Dalton, K., Casais, R., Shaw, K., Stirrups, K., Evans, S., Britton, P., Brown, T.D., Cavanagh, D.,** 2001. cis-acting sequences required for coronavirus infectious bronchitis virus defective-RNA replication and packaging. *J. Virol.* **75**, 125-133.
- de Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., Woo, P.C.Y., Ziebuhr, J.,** 2011. Coronaviridae, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 774-796.
- Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M., Selisko, B., Alvarez, K., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Canard, B.,** 2008. Coronavirus nonstructural protein 16 is a cap-0 binding enzyme possessing (nucleoside-2'O)-methyltransferase activity. *J. Virol.* **82**, 8071-8084.
- DeDiego, M.L., Nieto-Torres, J.L., Jiménez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Alvarez, E., Oliveros, J.C., Zhao, J., Fett, C., Perlman, S., Enjuanes, L.,** 2011. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS Pathog.* **7**, e1002315.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjostrom, H., Noren, O., Laude, H.,** 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417-420.
- Delmas, B., Laude, H.,** 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* **64**, 5367-5375.
- Deming, D.J., Graham, R.L., Denison, M.R., Baric, R.S.,** 2007. Processing of open reading frame 1a replicase proteins nsp7 to nsp10 in murine hepatitis virus strain A59 replication. *J. Virol.* **81**, 10280-10291.
- Devaraj, S.G., Wang, N., Chen, Z., Chen, Z., Tseng, M., Barretto, N., Lin, R., Peters, C.J., Tseng, C.T., Baker, S.C., Li, K.,** 2007. Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Biol. Chem.* **282**, 32208-32221.
- Dewan, V., Reader, J., Forsyth, K.M.,** 2014. Role of aminoacyl-tRNA synthetases in infectious diseases and targets for therapeutic development. *Top Curr. Chem.* **344**, 293-329.

- Dominguez, S.R., O'Shea, T.J., Oko, L.M., Holmes, K.V.,** 2007. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1295-1300.
- Doyle, L.P., Hutchings, L.M.,** 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **108**, 257-259.
- Dreher, T.W.,** 2009. Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res.* **139**, 217-229.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriu, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H., Doerr, H.W.,** 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967-1976.
- Eckerle, L.D., Becker, M.M., Halpin, R.A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R.L., Baric, R.S., Stockwell, T.B., Spiro, D.J., Denison, M.R.,** 2010. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog.* **6**, e1000896.
- Eckerle, L.D., Lu, X., Sperry, S.M., Choi, L., Denison, M.R.,** 2007. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J. Virol.* **81**, 12135-12144.
- Egloff, M.P., Ferron, F., Campanacci, V., Longhi, S., Rancurel, C., Dutartre, H., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Cambillau, C., Canard, B.,** 2004. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 3792-3796.
- Enjuanes, L., Almazán, F., Sola, I., Zúñiga, S.,** 2006a. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu Rev. Microbiol.* **60**, 211-230.
- Enjuanes, L., Almazán, F., Sola, I., Zúñiga, S., Alvarez, E., Reguera, J., Capiscol, C.,** 2006b. Biochemical aspects of coronavirus replication. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 13-24.
- Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., Snijder, E.J.,** 2008. The Nidovirales, in: Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Third Edition ed. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419-430.
- Enjuanes, L., Van der Zeijst, B.A.M.,** 1995. Molecular basis of transmissible gastroenteritis coronavirus epidemiology, in: Siddell, S.G. (Ed.), *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, pp. 337-376.
- Escors, D., Camafeita, E., Ortego, J., Laude, H., Enjuanes, L.,** 2001. Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J. Virol.* **75**, 12228-12240.
- Escors, D., Izeta, A., Capiscol, C., Enjuanes, L.,** 2003. Transmissible gastroenteritis coronavirus packaging signal is located at the 5' end of the virus genome. *J. Virol.* **77**, 7890-7902.
- Feng, Q., Langereis, M.A., Olganier, D., Chiang, C., van de Winkel, R., van Essen, P., Zoll, J., Hiscott, J., van Kuppeveld, F.J.,** 2014. Coxsackievirus cloverleaf RNA

containing a 5' triphosphate triggers an antiviral response via RIG-I activation. *PLoS One* **9**, e95927.

Freundt, E.C., Yu, L., Park, E., Lenardo, M.J., Xu, X.N., 2009. Molecular determinants for subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame 3b protein. *J. Virol.* **83**, 6631-6640.

Frieman, M., Ratia, K., Johnston, R.E., Mesecar, A.D., Baric, R.S., 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* **83**, 6689-6705.

Gadlage, M.J., Sparks, J.S., Beachboard, D.C., Cox, R.G., Doyle, J.D., Stobart, C.C., Denison, M.R., 2010. Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J. Virol.* **84**, 280-290.

Galán, C., Sola, I., Nogales, A., Thomas, B., Akoulitchiev, A., Enjuanes, L., Almazán, F., 2009. Host cell proteins interacting with the 3' end of TGEV coronavirus genome influence virus replication. *Virology* **391**, 304-314.

Gallagher, T.M., Buchmeier, M.J., 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**, 371-374.

Garcia, M.A., Meurs, E.F., Esteban, M., 2007. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie.* **89**, 799-811.

Gebauer, F., Preiss, T., Hentze, M.W., 2012. From cis-regulatory elements to complex RNPs and back. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a012245.

Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Gottsche, M., Panning, M., Drexler, J.F., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., Muller, M., Pfefferle, S., Drosten, C., 2008. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 626-631.

Goebel, S.J., Hsue, B., Dombrowski, T.F., Masters, P.S., 2004a. Characterization of the RNA components of a putative molecular switch in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **78**, 669-682.

Goebel, S.J., Taylor, J., Masters, P.S., 2004b. The 3' cis-acting genomic replication element of the severe acute respiratory syndrome coronavirus can function in the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **78**, 7846-7851.

Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**, 17-37.

Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., Baker, S.C., 2002. RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* **76**, 3697-3708.

Graham, R.L., Denison, M.R., 2006. Replication of murine hepatitis virus is regulated by papain-like proteinase 1 processing of nonstructural proteins 1, 2, and 3. *J. Virol.* **80**, 11610-11620.

Graham, R.L., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2013. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 836-848.

- Graham, R.L., Sims, A.C., Brockway, S.M., Baric, R.S., Denison, M.R.,** 2005. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* **79**, 13399-13411.
- Grossoehme, N.E., Li, L., Keane, S.C., Liu, P., Dann, C.E., 3rd, Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P.,** 2009. Coronavirus N protein N-terminal domain (NTD) specifically binds the transcriptional regulatory sequence (TRS) and melts TRS-cTRS RNA duplexes. *J. Mol. Biol.* **394**, 544-557.
- Guan, B.J., Su, Y.P., Wu, H.Y., Brian, D.A.,** 2012. Genetic evidence of a long-range RNA-RNA interaction between the genomic 5' untranslated region and the nonstructural protein 1 coding region in murine and bovine coronaviruses. *J. Virol.* **86**, 4631-4643.
- Guan, B.J., Wu, H.Y., Brian, D.A.,** 2011. An optimal cis-replication stem-loop IV in the 5' untranslated region of the mouse coronavirus genome extends 16 nucleotides into open reading frame 1. *J. Virol.* **85**, 5593-5605.
- Guo, M., Schimmel, P.,** 2013. Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 145-153.
- Gustin, K.M., Guan, B.J., Dziduszko, A., Brian, D.A.,** 2009. Bovine coronavirus nonstructural protein 1 (p28) is an RNA binding protein that binds terminal genomic cis-replication elements. *J. Virol.* **83**, 6087-6097.
- Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T.,** 2009. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* **83**, 5137-5147.
- Hassel, B.A., Zhou, A., Sotomayor, C., Maran, A., Silverman, R.H.,** 1993. A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO j.* **12**, 3297-3304.
- Hovanessian, A.G., Brown, R.E., Kerr, I.M.,** 1977. Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme from interferon-treated cells. *Nature* **268**, 537-540.
- Hsue, B., Hartshorne, T., Masters, P.S.,** 2000. Characterization of an essential RNA secondary structure in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **74**, 6911-6921.
- Hsue, B., Masters, P.S.,** 1997. A bulged stem-loop structure in the 3' untranslated region of the genome of the coronavirus mouse hepatitis virus is essential for replication. *J. Virol.* **71**, 7567-7578.
- Huang, C., Ito, N., Tseng, C.T., Makino, S.,** 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J. Virol.* **80**, 7287-7294.
- Huang, C., Peters, C.J., Makino, S.,** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus accessory protein 6 is a virion-associated protein and is released from 6 protein-expressing cells. *J. Virol.* **81**, 5423-5426.
- Huang, P., Lai, M.M.,** 1999. Polypyrimidine tract-binding protein binds to the complementary strand of the mouse hepatitis virus 3' untranslated region, thereby altering RNA conformation. *J. Virol.* **73**, 9110-9116.

- Huang, P., Lai, M.M.**, 2001. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a1 binds to the 3'-untranslated region and mediates potential 5'-3'-end cross talks of mouse hepatitis virus RNA. *J. Virol.* **75**, 5009-5017.
- Huang, Y.W., Dickerman, A.W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., Meng, X.J.**, 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. *mBio* **4**, e00737-00713.
- Husser, L., Alves, M.P., Ruggli, N., Summerfield, A.**, 2011. Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference. *Virus Res.* **159**, 9-16.
- Ibba, M., Soll, D.**, 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 617-650.
- Imbert, I., Guillemot, J.C., Bourhis, J.M., Bussetta, C., Coutard, B., Egloff, M.P., Ferron, F., Gorbalenya, A.E., Canard, B.**, 2006. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO j.* **25**, 4933-4942.
- Imbert, I., Snijder, E.J., Dimitrova, M., Guillemot, J.C., Lecine, P., Canard, B.**, 2008. The SARS-Coronavirus PLnc domain of nsp3 as a replication/transcription scaffolding protein. *Virus Res.* **133**, 136-148.
- Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., Akira, S.**, 2008. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* **3**, 352-363.
- Ito, N., Mossel, E.C., Narayanan, K., Popov, V.L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C.J., Makino, S.**, 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J. Virol.* **79**, 3182-3186.
- Ivanov, K.A., Hertzog, T., Rozanov, M., Bayer, S., Thiel, V., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J.**, 2004a. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 12694-12699.
- Ivanov, K.A., Thiel, V., Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Snijder, E.J., Ziebuhr, J.**, 2004b. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J. Virol.* **78**, 5619-5632.
- Ivanov, K.A., Ziebuhr, J.**, 2004. Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J. Virol.* **78**, 7833-7838.
- Izeta, A., Smerdou, C., Alonso, S., Penzes, Z., Mendez, A., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 1999. Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *J. Virol.* **73**, 1535-1545.
- Jacobs, L., van der Zeijst, B.A., Horzinek, M.C.**, 1986. Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* **57**, 1010-1015.
- Jensen, S., Thomsen, A.R.**, 2012. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J. Virol.* **86**, 2900-2910.
- Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., Fox, P.L.**, 2008. WHEP domains direct noncanonical function of glutamyl-Prolyl tRNA synthetase in translational control of gene expression. *Mol. Cell* **29**, 679-690.

- Jiménez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J., Enjuanes, L.,** 1986. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* **60**, 131-139.
- Jiménez-Guardeño, J.M., Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castano-Rodriguez, C., Enjuanes, L.,** 2014. The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004320.
- Kang, H., Feng, M., Schroeder, M.E., Giedroc, D.P., Leibowitz, J.L.,** 2006. Putative cis-acting stem-loops in the 5' untranslated region of the severe acute respiratory syndrome coronavirus can substitute for their mouse hepatitis virus counterparts. *J. Virol.* **80**, 10600-10614.
- Kanjanahaluethai, A., Chen, Z., Jukneliene, D., Baker, S.C.,** 2007. Membrane topology of murine coronavirus replicase nonstructural protein 3. *Virology* **361**, 391-401.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., Akira, S.,** 2008. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* **205**, 1601-1610.
- Kindler, E., Thiel, V.,** 2014. To sense or not to sense viral RNA--essentials of coronavirus innate immune evasion. *Curr. Opin. Microbiol.* **20**, 69-75.
- King, B., Potts, B.J., Brian, D.A.,** 1985. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. *Virus Res.* **2**, 53-59.
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H., Zevenhoven-Dobbe, J.C., van der Meer, Y., Koster, A.J., Mommaas, A.M., Snijder, E.J.,** 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **6**, e226.
- Kohlmeier, J.E., Woodland, D.L.,** 2009. Immunity to respiratory viruses. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 61-82.
- Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A., Palese, P.,** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.* **81**, 548-557.
- Kuo, L., Masters, P.S.,** 2003. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.* **77**, 4597-4608.
- Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, M.M.C., Perlman, S., Anderson, L.J.,** 2007. Coronaviridae, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E. (Eds.), *Fields Virology*, Fifth Edition ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1337-1356.
- Launer-Felty, K., Cole, J.L.,** 2014. Domain interactions in adenovirus VAI RNA mediate high-affinity PKR binding. *J Mol Biol* **426**, 1285-1295.
- Lee, C.W., Li, L., Giedroc, D.P.,** 2011. The solution structure of coronaviral stem-loop 2 (SL2) reveals a canonical CUYG tetraloop fold. *FEBS Lett.* **585**, 1049-1053.

- Lee, N.R., Kwon, H.M., Park, K., Oh, S., Jeong, Y.J., Kim, D.E.**, 2010. Cooperative translocation enhances the unwinding of duplex DNA by SARS coronavirus helicase nsP13. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7626-7636.
- Li, G., Chen, Q., Harmon, K.M., Yoon, K.J., Schwartz, K.J., Hoogland, M.J., Gauger, P.C., Main, R.G., Zhang, J.**, 2014. Full-Length Genome Sequence of Porcine Deltacoronavirus Strain USA/IA/2014/8734. *Genome Announc.* **2**, e00278-14.
- Li, H.P., Huang, P., Park, S., Lai, M.M.**, 1999. Polypyrimidine tract-binding protein binds to the leader RNA of mouse hepatitis virus and serves as a regulator of viral transcription. *J. Virol.* **73**, 772-777.
- Li, H.P., Zhang, X., Duncan, R., Comai, L., Lai, M.M.**, 1997. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**, 9544-9549.
- Li, J., Liu, Y., Zhang, X.**, 2010. Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5. *J. Virol.* **84**, 6472-6482.
- Li, L., Kang, H., Liu, P., Makkinje, N., Williamson, S.T., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P.**, 2008. Structural lability in stem-loop 1 drives a 5' UTR-3' UTR interaction in coronavirus replication. *J. Mol. Biol.* **377**, 790-803.
- Liu, P., Li, L., Keane, S.C., Yang, D., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P.**, 2009. Mouse hepatitis virus stem-loop 2 adopts a uYNMG(U)a-like tetraloop structure that is highly functionally tolerant of base substitutions. *J. Virol.* **83**, 12084-12093.
- Liu, P., Li, L., Millership, J.J., Kang, H., Leibowitz, J.L., Giedroc, D.P.**, 2007. A U-turn motif-containing stem-loop in the coronavirus 5' untranslated region plays a functional role in replication. *RNA* **13**, 763-780.
- Liu, Q., Johnson, R.F., Leibowitz, J.L.**, 2001. Secondary structural elements within the 3' untranslated region of mouse hepatitis virus strain JHM genomic RNA. *J. Virol.* **75**, 12105-12113.
- Lu, X., Pan, J., Tao, J., Guo, D.**, 2011. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN-beta response by targeting initial step of IFN-beta induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes* **42**, 37-45.
- Madhugiri, R., Fricke, M., Marz, M., Ziebuhr, J.**, 2014. RNA structure analysis of alphacoronavirus terminal genome regions. *Virus Res.* **194**, 76-89.
- Marthaler, D., Bruner, L., Collins, J., Rossow, K.**, 2014. Third strain of porcine epidemic diarrhea virus, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 2162-2163.
- Masters, P.S.**, 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **66**, 193-292.
- Mazumder, B., Li, X., Barik, S.**, 2010. Translation control: a multifaceted regulator of inflammatory response. *J. Immunol.* **184**, 3311-3319.
- Mazumder, B., Seshadri, V., Imataka, H., Sonenberg, N., Fox, P.L.**, 2001. Translational silencing of ceruloplasmin requires the essential elements of mRNA circularization: poly(A) tail, poly(A)-binding protein, and eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6440-6449.

- McClurkin, A.W., Norman, J.O.**, 1966. Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **30**, 190-198.
- McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Hardison, K.A., Hartley, J.W., Chanock, R.M.**, 1969. Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. *J. Immunol.* **102**, 1109-1118.
- Menachery, V.D., Yount, B.L., Jr., Josset, L., Gralinski, L.E., Scobey, T., Agnihothram, S., Katze, M.G., Baric, R.S.**, 2014. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-methyltransferase activity. *J. Virol.* **88**, 4251-4264.
- Miknis, Z.J., Donaldson, E.F., Umland, T.C., Rimmer, R.A., Baric, R.S., Schultz, L.W.**, 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J. Virol.* **83**, 3007-3018.
- Mino, T., Takeuchi, O.**, 2013. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **29**, 49-60.
- Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A.E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., Ziebuhr, J.**, 2006. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 5108-5113.
- Mogensen, T.H.**, 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 240-273.
- Mukhopadhyay, R., Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., Fox, P.L.**, 2009. The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 324-331.
- Nakayama, Y., Plisch, E.H., Sullivan, J., Thomas, C., Czuprynski, C.J., Williams, B.R., Suresh, M.**, 2010. Role of PKR and Type I IFNs in viral control during primary and secondary infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1000966.
- Nanda, S.K., Johnson, R.F., Liu, Q., Leibowitz, J.L.**, 2004. Mitochondrial HSP70, HSP40, and HSP60 bind to the 3' untranslated region of the Murine hepatitis virus genome. *Arch. Virol.* **149**, 93-111.
- Nanda, S.K., Leibowitz, J.L.**, 2001. Mitochondrial aconitase binds to the 3' untranslated region of the mouse hepatitis virus genome. *J. Virol.* **75**, 3352-3362.
- Narayanan, K., Makino, S.**, 2001. Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA packaging. *J. Virol.* **75**, 9059-9067.
- Nguyen, V.P., Hogue, B.G.**, 1997. Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.* **71**, 9278-9284.
- Niemeyer, D., Zillinger, T., Muth, D., Zielecki, F., Horvath, G., Suliman, T., Barchet, W., Weber, F., Drosten, C., Muller, M.A.**, 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus accessory protein 4a is a type I interferon antagonist. *J. Virol.* **87**, 12489-12495.

- Nieto-Torres, J.L., DeDiego, M.L., Verdia-Baguena, C., Jiménez-Guardeño, J.M., Regla-Nava, J.A., Fernandez-Delgado, R., Castano-Rodriguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L.**, 2014. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004077.
- Nogales, A.**, 2012. Proteínas virales y celulares implicadas en la replicación de Coronavirus, Departamento de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Nogales, A., Márquez-Jurado, S., Galán, C., Enjuanes, L., Almazán, F.**, 2012. Transmissible gastroenteritis coronavirus RNA-dependent RNA polymerase and nonstructural proteins 2, 3, and 8 are incorporated into viral particles. *J. Virol.* **86**, 1261-1266.
- Oostra, M., Hagemeijer, M.C., van Gent, M., Bekker, C.P., te Lintelo, E.G., Rottier, P.J., de Haan, C.A.**, 2008. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J. Virol.* **82**, 12392-12405.
- Oostra, M., te Lintelo, E.G., Deijs, M., Verheije, M.H., Rottier, P.J., de Haan, C.A.**, 2007. Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. *J. Virol.* **81**, 12323-12336.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L.**, 2002. Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* **76**, 11518-11529.
- Page, K.W., Britton, P., Bourns, M.E.**, 1990. Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virus Genes* **4**, 289-301.
- Pasternak, A.O., van den Born, E., Spaan, W.J., Snijder, E.J.**, 2001. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO j.* **20**, 7220-7228.
- Pensaert, M., Van Reeth, K.**, 1998. Porcine epidemic diarrhea and porcine respiratory coronavirus, Proceedings of the 29th Annual meeting of the American Association of Swine Practitioners. American Association of Swine Practitioners (AASP), Des Moines, pp. 433-436.
- Penzes, Z., Gonzalez, J.M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Mendez, A., Sánchez, C.M., Sola, I., Almazán, F., Enjuanes, L.**, 2001. Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* **23**, 105-118.
- Perlman, S., Lane, T.E., Buchmeier, M.J.**, 2000. Coronavirus: hepatitis, peritonitis, and central nervous system disease, in: Cunningham, M.W., Fujinami, R.S. (Eds.), Effects of microbes on the immune system. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 331-348.
- Perlman, S., Netland, J.**, 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439-450.

- Perlman, S., Pewe, L.,** 1998. Role of CTL mutants in demyelination induced by mouse hepatitis virus, strain JHM. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 515-519.
- Pettit Kneller, E.L., Connor, J.H., Lyles, D.S.,** 2009. hnRNPs Relocalize to the cytoplasm following infection with vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **83**, 770-780.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., Reis e Sousa, C.,** 2009. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* **83**, 10761-10769.
- Quaresma, A.J., Bressan, G.C., Gava, L.M., Lanza, D.C., Ramos, C.H., Kobarg, J.,** 2009. Human hnRNP Q re-localizes to cytoplasmic granules upon PMA, thapsigargin, arsenite and heat-shock treatments. *Exp. Cell Res.* **315**, 968-980.
- Raman, S., Bouma, P., Williams, G.D., Brian, D.A.,** 2003. Stem-loop III in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **77**, 6720-6730.
- Raman, S., Brian, D.A.,** 2005. Stem-loop IV in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **79**, 12434-12446.
- Rodríguez Pulido, M.R., Sobrino, F., Borrego, B. and, Sáiz, M.,** 2013. Use of RNA Domains in the Viral Genome as Innate Immunity Inducers for Antiviral Strategies and Vaccine Improvement, *in*: Romanowski, V. (Ed.), Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications InTech.
- Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C., Burns, C., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Sánchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A.D., Drosten, C., Pallansch, M.A., Anderson, L.J., Bellini, W.J.,** 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394-1399.
- Saif, L.J., Wesley, R.D.,** 1992. Transmissible gastroenteritis, *in*: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Disease of Swine. Wolfe Publishing Ltd, Ames, Iowa, pp. 362-386.
- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., Gale, M., Jr.,** 2008. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* **454**, 523-527.
- Salanueva, I.J., Carrascosa, J.L., Risco, C.,** 1999. Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* **73**, 7952-7964.
- Sambrook, J., Russell, D.W.,** 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, Third Edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Fox, P.L.,** 2003. Transcript-selective translational silencing by gamma interferon is directed by a novel structural element in the ceruloplasmin mRNA 3' untranslated region. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1509-1519.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C.A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S.M., Dignam, J.D., Kim, S., Driscoll, D.M., Fox, P.L.,** 2004. Noncanonical

function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* **119**, 195-208.

Sánchez, C.M., Izeta, A., Sánchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 1999. Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* **73**, 7607-7618.

Sánchez, C.M., Jiménez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Sune, C., Bullido, M., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M., et al., 1990. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* **174**, 410-417.

Sawicki, D.L., Sawicki, S.G., 2001. Chromatography of mouse hepatitis virus replicative intermediate and replicative form RNA. *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**, 483-489.

Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., 1990. Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* **64**, 1050-1056.

Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., Siddell, S.G., 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**, 20-29.

Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M., Pekosz, A., 2007. The ORF7b protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J. Virol.* **81**, 718-731.

Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G., Thiel, V., 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**, 6620-6630.

Seybert, A., Hegyi, A., Siddell, S.G., Ziebuhr, J., 2000. The human coronavirus 229E superfamily 1 helicase has RNA and DNA duplex-unwinding activities with 5'-to-3' polarity. *RNA* **6**, 1056-1068.

Seybert, A., Posthuma, C.C., van Dinten, L.C., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., 2005. A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J. Virol.* **79**, 696-704.

Shen, S., Lin, P.S., Chao, Y.C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.J., 2005. The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 286-292.

Shen, X., Masters, P.S., 2001. Evaluation of the role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 as a host factor in murine coronavirus discontinuous transcription and genome replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 2717-2722.

Shi, S.T., Huang, P., Li, H.P., Lai, M.M., 2000. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates RNA synthesis of a cytoplasmic virus. *EMBO j.* **19**, 4701-4711.

Shi, S.T., Lai, M.M., 2005. Viral and cellular proteins involved in coronavirus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 95-131.

Siddell, S., Sawicki, D., Meyer, Y., Thiel, V., Sawicki, S., 2001. Identification of the mutations responsible for the phenotype of three MHV RNA-negative ts mutants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **494**, 453-458.

- Siu, K.L., Yeung, M.L., Kok, K.H., Yuen, K.S., Kew, C., Lui, P.Y., Chan, C.P., Tse, H., Woo, P.C., Yuen, K.Y., Jin, D.Y.,** 2014. Middle east respiratory syndrome coronavirus 4a protein is a double-stranded RNA-binding protein that suppresses PACT-induced activation of RIG-I and MDA5 in the innate antiviral response. *J Virol* **88**, 4866-4876.
- Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J., van der Meulen, J., Koerten, H.K., Mommaas, A.M.,** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* **80**, 5927-5940.
- Sola, I., Galán, C., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Zúñiga, S., Cruz, J.L., Almazán, F., Enjuanes, L.,** 2011a. The polypyrimidine tract-binding protein affects coronavirus RNA accumulation levels and relocalizes viral RNAs to novel cytoplasmic domains different from replication-transcription sites. *J. Virol.* **85**, 5136-5149.
- Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L.,** 2011b. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* **8**, 237-248.
- Sola, I., Moreno, J.L., Zúñiga, S., Alonso, S., Enjuanes, L.,** 2005. Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* **79**, 2506-2516.
- Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L.,** 2015. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* En prensa.
- Song, D., Park, B.,** 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* **44**, 167-175.
- Spagnolo, J.F., Hogue, B.G.,** 2000. Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly(A) tail for coronavirus defective genome replication. *J. Virol.* **74**, 5053-5065.
- Stadler, K., Massignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H.D., Rappuoli, R.,** 2003. SARS--beginning to understand a new virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 209-218.
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Weber, F., Kochs, G.,** 2007. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* **361**, 304-315.
- Strieter, R.M., Belperio, J.A., Keane, M.P.,** 2002. Cytokines in innate host defense in the lung. *J. Clin. Invest.* **109**, 699-705.
- Stumpo, D.J., Lai, W.S., Blackshear, P.J.,** 2010. Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **1**, 60-80.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V.,** 1977. Characterization of coronavirus II. Glycoproteins of the viral envelope: tryptic peptide analysis. *Virology* **77**, 650-660.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J.,** 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33**, 449-462.
- Subissi, L., Posthuma, C.C., Collet, A., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Gorbalenya, A.E., Decroly, E., Snijder, E.J., Canard, B., Imbert, I.,** 2014. One severe acute respiratory

syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **111**, E3900-3909.

Sutton, G., Fry, E., Carter, L., Sainsbury, S., Walter, T., Nettleship, J., Berrow, N., Owens, R., Gilbert, R., Davidson, A., Siddell, S., Poon, L.L., Diprose, J., Alderton, D., Walsh, M., Grimes, J.M., Stuart, D.I., 2004. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* **12**, 341-353.

Tanner, J.A., Watt, R.M., Chai, Y.B., Lu, L.Y., Lin, M.C., Peiris, J.S., Poon, L.L., Kung, H.F., Huang, J.D., 2003. The severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/helicase belongs to a distinct class of 5' to 3' viral helicases. *J. Biol. Chem.* **278**, 39578-39582.

te Velthuis, A.J., Arnold, J.J., Cameron, C.E., van den Worm, S.H., Snijder, E.J., 2010. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res.* **38**, 203-214.

Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., 2003. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* **84**, 2305-2315.

Tijms, M.A., Snijder, E.J., 2003. Equine arteritis virus non-structural protein 1, an essential factor for viral subgenomic mRNA synthesis, interacts with the cellular transcription co-factor p100. *J. Gen. Virol.* **84**, 2317-2322.

Tong, S., Conrardy, C., Ruone, S., Kuzmin, I.V., Guo, X., Tao, Y., Niezgoda, M., Haynes, L., Agwanda, B., Breiman, R.F., Anderson, L.J., Rupprecht, C.E., 2009. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 482-485.

Tooze, J., Tooze, S., Warren, G., 1984. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell Biol.* **33**, 281-293.

Totura, A.L., Baric, R.S., 2012. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 264-275.

Tsai, W.-C., Lloyd, R.E., 2014. Cytoplasmic RNA Granules and Viral Infection. *Annual Review of Virology* **1**, 147-170.

Uzri, D., Gehrke, L., 2009. Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities. *J. Virol.* **83**, 4174-4184.

van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B., 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368-373.

van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J., Snijder, E.J., 1999. Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 12056-12061.

- Vaughn, E.M., Halbur, P.G., Paul, P.S.,** 1995. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. *J. Virol.* **69**, 3176-3184.
- Verdia-Baguena, C., Nieto-Torres, J.L., Alcaraz, A., Dediego, M.L., Enjuanes, L., Aguilera, V.M.,** 2013. Analysis of SARS-CoV E protein ion channel activity by tuning the protein and lipid charge. *Biochim. Biophys Acta* **1828**, 2026-2031.
- Verdia-Baguena, C., Nieto-Torres, J.L., Alcaraz, A., DeDiego, M.L., Torres, J., Aguilera, V.M., Enjuanes, L.,** 2012. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. *Virology* **432**, 485-494.
- Verheije, M.H., Hagemeijer, M.C., Ulasli, M., Reggiori, F., Rottier, P.J., Masters, P.S., de Haan, C.A.,** 2010. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. *J. Virol.* **84**, 11575-11579.
- Wang, K., Boysen, C., Shizuya, H., Simon, M.I., Hood, L.,** 1997. Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *Biotechniques* **23**, 992-994.
- Williams, A.K., Wang, L., Sneed, L.W., Collisson, E.W.,** 1993. Analysis of a hypervariable region in the 3' non-coding end of the infectious bronchitis virus genome. *Virus Res.* **28**, 19-27.
- Williams, G.D., Chang, R.Y., Brian, D.A.,** 1999. A phylogenetically conserved hairpin-type 3' untranslated region pseudoknot functions in coronavirus RNA replication. *J. Virol.* **73**, 8349-8355.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S., Yuen, K.Y.,** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**, 884-895.
- Woo, P.C., Wang, M., Lau, S.K., Xu, H., Poon, R.W., Guo, R., Wong, B.H., Gao, K., Tsoi, H.W., Huang, Y., Li, K.S., Lam, C.S., Chan, K.H., Zheng, B.J., Yuen, K.Y.,** 2007. Comparative analysis of twelve genomes of three novel group 2c and group 2d coronaviruses reveals unique group and subgroup features. *J. Virol.* **81**, 1574-1585.
- Woods, R.D., Wesley, R.D.,** 1998. Transmissible gastroenteritis coronavirus carrier sow. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**, 641-647.
- Xu, L., Khadijah, S., Fang, S., Wang, L., Tay, F.P., Liu, D.X.,** 2010. The cellular RNA helicase DDX1 interacts with coronavirus nonstructural protein 14 and enhances viral replication. *J. Virol.* **84**, 8571-8583.
- Yang, D., Liu, P., Giedroc, D.P., Leibowitz, J.,** 2011. Mouse hepatitis virus stem-loop 4 functions as a spacer element required to drive subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **85**, 9199-9209.
- Ye, Y., Hauns, K., Langland, J.O., Jacobs, B.L., Hogue, B.G.,** 2007. Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J. Virol.* **81**, 2554-2563.
- Yount, B., Roberts, R.S., Lindesmith, L., Baric, R.S.,** 2006. Rewiring the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) transcription circuit: engineering a recombination-resistant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 12546-12551.

- Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A.,** 2012. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814-1820.
- Zhai, Y., Sun, F., Li, X., Pang, H., Xu, X., Bartlam, M., Rao, Z.,** 2005. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 980-986.
- Zhao, L., Jha, B.K., Wu, A., Elliott, R., Ziebuhr, J., Gorbalenya, A.E., Silverman, R.H., Weiss, S.R.,** 2012. Antagonism of the interferon-induced OAS-RNase L pathway by murine coronavirus ns2 protein is required for virus replication and liver pathology. *Cell Host Microbe* **11**, 607-616.
- Zhong, Y., Tan, Y.W., Liu, D.X.,** 2012. Recent progress in studies of arterivirus- and coronavirus-host interactions. *Viruses* **4**, 980-1010.
- Ziebuhr, J.,** 2005. The coronavirus replicase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 57-94.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E.,** 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* **81**, 853-879.
- Zinzula, L., Tramontano, E.,** 2013. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: hide, mask, hit. *Antiviral Res.* **100**, 615-635.
- Zuker, M.,** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406-3415.
- Zúñiga, S., Cruz, J.L., Sola, I., Mateos-Gomez, P.A., Palacio, L., Enjuanes, L.,** 2010. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* **84**, 2169-2175.
- Zúñiga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L.,** 2004. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **78**, 980-994.
- Zúñiga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.,** 2007. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* **357**, 215-227.
- Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B.W., Ziebuhr, J., Szretter, K.J., Baker, S.C., Barchet, W., Diamond, M.S., Siddell, S.G., Ludewig, B., Thiel, V.,** 2011. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat. Immunol.* **12**, 137-143.
- Zust, R., Miller, T.B., Goebel, S.J., Thiel, V., Masters, P.S.,** 2008. Genetic interactions between an essential 3' cis-acting RNA pseudoknot, replicase gene products, and the extreme 3' end of the mouse coronavirus genome. *J. Virol.* **82**, 1214-1228.

X. ANEXO
